

**KINETIKA DAN VARIABEL OPTIMUM
FERMENTASI ASAM LAKTAT DENGAN MEDIA
CAMPURAN TEPUNG TAPIOKA DAN LIMBAH CAIR TAHU
OLEH *RHIZOPUS ORYZAE***



**Tesis
Untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat S-2 pada
Program Studi Teknik kimia**

**Rintis Manfaati
L4C008019**

**PROGRAM MAGISTER TEKNIK KIMIA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2010**

ABSTRAK

Campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu dapat digunakan sebagai alternatif media fermentasi yang murah untuk menghasilkan asam laktat dengan menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*. *Rhizopus oryzae* memiliki kemampuan melakukan proses sakarifikasi dan fermentasi secara berkesinambungan (SSF, Simultaneous Saccharification and Fermentation) dalam satu tahap. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari karakteristik dari tepung tapioka dan limbah cair tahu sebagai media fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae*, mempelajari pengaruh rasio C/N dan laju pengadukan terhadap pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat, menentukan parameter kinetika fermentasi asam laktat yaitu laju pertumbuhan spesifik (μ), laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m), tetapan kejenuhan substrat (K_s), konstanta penggunaan substrat (k_3), perolehan/yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$) dan perolehan/yield produk terhadap substrat ($Y_{P/S}$), menentukan konsentrasi amilum dan laju pengadukan optimum untuk pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat. Proses fermentasi dilakukan secara batch dalam erlemeyer 250 ml dengan volume media produksi 100 ml. Media produksi kemudian diinokulasi dengan 7 ml inokulum, dan ditempatkan dalam Incubator shaker dengan suhu 30°C , $\text{pH} \pm 6$, dan waktu fermentasi 72 jam. Dari percobaan tersebut diperoleh profil, parameter kinetika dan rasio C/N dan laju pengadukan relatif optimum. Selain itu dilakukan pula penelitian dengan rancangan percobaan 2^2 full factorial composite design dan pengolahan data dengan Response Surface Methods untuk mendapatkan pengaruh dan kondisi optimum konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa dan asam laktat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa limbah cair tahu memiliki kandungan nitrogen yang mencukupi untuk pembentukan asam laktat yaitu 5 g/l, kandungan karbon relatif sedikit yaitu 1,1 g/l, sehingga harus dilakukan penambahan unsur C dari sumber lain. Rasio C/N relatif optimum dan laju pengadukan relatif optimum untuk pertumbuhan biomassa dan pembentukan asam laktat adalah 2,4-3,2 dan 150 rpm, μ_m adalah $0,046 \text{ jam}^{-1}$, K_s adalah 4,324 g/l, k_3 tertinggi adalah $0,031 \text{ jam}^{-1}$, $Y_{X/S}$ tertinggi adalah 0,182 dan $Y_{P/S}$ tertinggi adalah 0,415. Konsentrasi biomassa maksimum adalah 6 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 43 g/l dan laju pengadukan 176 rpm. Konsentrasi asam laktat maksimum adalah 8,26 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 40 g/l dan laju pengadukan 139 rpm.

Kata kunci : tepung tapioka, limbah cair tahu, *Rhizopus oryzae*, asam laktat.

ABSTRACT

*Compounding of tapioca flour and tofu liquid waste can be used as an alternative medium for fermentation which is cheap to produce lactic acid by using *Rhizopus oryzae* fungus. *Rhizopus oryzae* has the ability to sustain saccharification process and fermentation (SSF, Simultaneous Saccharification and Fermentation) in a single stage. The objectives of the research were studying the characteristics of tapioca flour and tofu liquid waste as a medium for lactic acid production by *Rhizopus oryzae* fungus, investigating the effect of C/N ratio and agitation speed on biomass growth and lactic acid production, determining kinetic parameters of lactic acid fermentation i.e. specific growth rate (μ), maximum specific growth rate (μ_m), substrate saturation constant (K_s), substrate consumption constant (k_3), yield of biomass to substrate ($Y_{X/S}$) and yield of product to substrate ($Y_{P/S}$), analyzing optimum amylum concentration and optimum agitation speed for biomass growth and lactic acid production. The lactic acid fermentation was done in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml final volume of medium for production. Furthermore, medium production was inoculated with 7 ml of seed culture. It was put in an incubator shaker with a temperature of 30 °C, pH of ± 6 for 72 hours. From that experiment, several data were found i.e. profile, parameters of kinetics, optimum relative of C/N ratio and agitation speed. Besides, this research used a 2² full factorial composite design and data processing by Response Surface Methods to obtain the effect and optimum condition of amylum concentration and agitation speed on biomass and lactic acid concentration. The results showed that tofu liquid waste has nitrogen content which is sufficient to produce lactic acid of 5 g/l, and a relatively low carbon content of 1.1 g/l. That needed additional C element from other source. Optimum relative of C/N ratio and agitation speed for biomass growth and lactic acid production was 2.4-3.2 and 150 rpm respectively, μ_m was 0.046 hr⁻¹, K_s was 4.324 g/l, maximum k_3 was 0.031 hr⁻¹, maximum $Y_{X/S}$ was 0.182 and maximum $Y_{P/S}$ was 0.415. Maximum biomass concentration was 6 g/l at amylum concentration of 43 g/l and agitation speed of 176 rpm. Maximum lactic acid concentration was 8.26 g/l at amylum concentration of 40 g/l and agitation speed of 139 rpm.*

Keywords: *tapioca flour, tofu liquid waste, *Rhizopus oryzae*, lactic acid.*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Asam laktat merupakan asam organik multifungsi yang potensial diproduksi dalam skala besar. Pertama kali diproduksi secara komersial oleh Charles E. Avery di Littleton, Massachusetts, USA pada tahun 1881. Perdagangan global asam laktat dan *lactate* (termasuk polimer) mencapai 100.000 ton per tahun dan menunjukkan tingkat pertumbuhan hampir 15%. 70 % dari total asam laktat yang diperdagangkan digunakan dalam makanan dan pengolahan makanan sebagai pengatur pH, bahan pengawet dan agent buffer [Jin Bo, *et al.*, 2005]. Asam laktat selain digunakan sebagai bahan pengawet makanan juga merupakan bahan baku (*feedstock*) industri polimer *biodegradable*, *oxygenated chemicals*, pengatur pertumbuhan tanaman, dan pelarut yang ramah lingkungan. Salah satu terapan yang paling menjanjikan dari asam laktat adalah sebagai bahan baku pembuatan PLA (*poly lactic acid*) yang bersifat *biodegradable* dan *biocompatible* sebagai alternatif pengganti plastik *non-biodegradable* yang dihasilkan dari minyak bumi, batu bara atau gas alam (Jin Bo *et al.*, 2005; J. M Dominguez *et al.*, 1999; Efremenko E *et al.*, 2006).

Asam laktat di alam berada dalam dua bentuk optikal isomer yaitu *D(-) lactic acid* dan *L(+) lactic acid*. *D(-) lactic acid* merupakan isomer yang bisa meracuni manusia sedangkan *L(+) lactic acid* adalah isomer yang dipilih untuk makanan dan industri farmasi, karena tubuh manusia hanya menghasilkan enzim *L-lactate dehydrogenase*. Isomer *L(+) lactic acid* juga merupakan bahan baku pembuatan PLA (Jin Bo *et al.*, 2005; J. M Dominguez *et al.*, 1999).

Asam laktat telah diproduksi secara komersial baik dengan proses sintesa kimia atau fermentasi bakterial. 70 – 80% asam laktat dunia diproduksi secara fermentasi bakterial sisanya diperoleh secara sintesa kimia dari hidrolisis *lactonitrile*. Produksi asam laktat secara sintetisa kimia selalu menghasilkan campuran dua isomer, sedangkan proses fermentasi akan menghasilkan asam laktat yang berisi salah satu isomer atau campuran dua isomer dengan perbandingan yang berbeda, tergantung pada mikroorganisma, substrat dan kondisi pertumbuhan. Keunggulan proses fermentasi dibandingkan sintesa kimia adalah dapat menghasilkan satu jenis isomer asam laktat yaitu *L (+) lactid acid* yang sesuai untuk bahan baku pembuatan PLA (*poly lactic acid*). Selain itu fermentasi asam laktat menggunakan bahan baku yang murah seperti whey, molase, *starch*, gula tebu dan bit, serta material lain yang kaya akan karbohidrat (Jin Bo *et al.*, 2005).

Fermentasi asam laktat oleh bakteri telah banyak dikembangkan. Bakteri *Lactobacillus delbreuckii* merupakan bakteri homofermentatif yang mampu menghasilkan asam laktat dalam jumlah cukup besar. Keterbatasan fermentasi bakterial adalah tingginya biaya untuk pretreatment hidrolisis substrat menjadi glukosa, penambahan nutrient spesifik seperti yeast ekstrak dan vitamin-B, pengaturan pH selama proses fermentasi untuk menjaga pertumbuhan bakteri, recovery dan purifikasi asam laktat pada proses hilir [Jin Bo *et al.*, 2005]. Penambahan yeast ekstrak 15% pada kultur *Lactobacillus delbreuckii* menghasilkan perolehan asam laktat tertinggi (Busairi and Mat HB, 2005).

Jamur *Rhizopus oryzae* merupakan spesies yang potensial untuk menghasilkan asam laktat. Fermentasi asam laktat dengan menggunakan *Rhizopus* lebih menguntungkan karena dapat menekan biaya untuk proses pretreatment bahan baku dan penyediaan komponen nitrogen kompleks seperti

yeast ekstrak. *Rhizopus* memiliki sifat *amylolytic* karena itu mampu menghasilkan asam laktat dari berbagai material *saccharidic* seperti tepung kentang tanpa proses *sacharifikasi* terlebih dahulu (J. M Dominguez *et al.*, 1999).

Rhizopus memiliki ketahanan cukup tinggi terhadap konsentrasi substrat dibandingkan jenis bakteri. Konsentrasi glukosa melebihi 50 g/l pada kultur bakteri akan menurunkan pertumbuhan karena terjadi penghambatan pertumbuhan oleh substrat (dehidrasi sel). Konsentrasi glukosa yang lebih tinggi (di atas 200 g/l) dapat ditoleransi oleh ragi dan jamur (Shuler and Kargi, 1992). Konsentrasi gula yang tinggi diharapkan akan menghasilkan perolehan asam laktat yang tinggi pula.

Gula dan tepung digunakan secara luas sebagai sumber karbon untuk media produksi asam laktat secara komersial. Berbagai bahan baku dari jenis tepung-tepungan seperti gandum, jagung, kentang, sorghum dan singkong telah banyak diteliti sebagai bahan baku sumber karbon yang potensial untuk produksi asam laktat. Tepung singkong (tapioka) merupakan tepung yang paling murah harganya (sekitar 32-64 US\$/ton) dibandingkan jenis tepung yang lain (Ghofar Abdul *et al.*, 2005). Sehingga penggunaan tepung tapioka sebagai sumber C diharapkan dapat menekan biaya produksi asam laktat.

Limbah cair tahu berasal dari kedelai yang sudah dimasak sehingga protein limbah cair tahu mempunyai nilai biologis yang lebih tinggi dari pada biji kedelai itu sendiri. Bahan-bahan organik yang terdapat dalam limbah cair tahu adalah protein (40-60%), karbohidrat (25-50%) dan lemak (10%). Selain itu dari beberapa hasil penelitian, limbah pengolahan tahu memiliki kadar BOD sekitar 5000-10.000 mg/l dan COD 7000-12.000 mg/l. Komponen nutrisi yang lengkap dari limbah cair tahu terutama kandungan proteinnya diharapkan

sesuai sebagai sumber N dan mineral untuk media fermentasi asam laktat (Ghofar Abdul *et al.*, 2005; Yuwono *et al.*, 2008).

Campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu dapat digunakan sebagai alternatif media fermentasi yang cukup murah untuk menghasilkan asam laktat dengan menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*. Selain itu pemanfaatan limbah cair tahu tersebut sebagai sumber protein dan mineral akan mengurangi tingkat pencemaran lingkungan.

Jin Bo *et al.* (2005) melakukan penelitian produksi asam laktat menggunakan jamur *rhizopus* dari limbah industri makanan berbahan baku kentang, jagung, tepung gandum dan nenas sebagai media produksi dengan konsentrasi 15 – 30 g/l starch atau gula. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *R. arrhizus* 36017 memiliki kemampuan menghidrolisa starch dan menghasilkan asam laktat (0,94–0,97 g/g starch/gula) lebih tinggi dibandingkan *R. oryzae* 2062 (0,65–0,76 g/g starch/gula). Sebaliknya *R. oryzae* memiliki kemampuan membentuk biomassa (17-19 g biomassa/l) lebih tinggi dibandingkan *R. arrhizus* 36017 (4-5 g biomassa/l). Laju pembentukan asam laktat dan biomassa tertinggi diperoleh dari media produksi limbah nenas, kemudian jagung, gandum dan kentang. Penambahan 2 g/l ammonium sulfat, yeast ekstrak atau peptone mestimulasi dan meningkatkan 8-15 % perolehan asam laktat dan 10-20% pembentukan biomassa jamur.

J.M Dominguez *et al.* (1999) mempelajari pengaruh aerasi, konsentrasi inokulum, pH dan penambahan kalsium karbonat pada fermentasi asam laktat oleh *R. oryzae* dalam media sintetis dengan substrat glukosa. Penelitian dilakukan dalam erlemeyer teraduk (*shaker flask*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengadukan akan menghasilkan ukuran pellet miselia yang seragam (diameter 1–2 mm). Konsentrasi spora awal menentukan peningkatan konsentrasi inokulum, konsentrasi asam laktat dan mengurangi

waktu fermentasi. Produktivitas volumetrik tertinggi adalah 1,13 g asam laktat/l.jam diperoleh pada erasi yang rendah yaitu pada perbandingan volume medium kultur terhadap volume erlemeyer 200/500. Aerasi yang rendah akan meningkatkan produksi asam laktat, sedangkan aerasi tinggi akan meningkatkan pembentukan spora. Penambahan kalsium karbonat secara bertahap akan mencegah penurunan pH selama proses fermentasi. Penambahan 5% kalsium karbonat diawal proses fermentasi dan 3% setelah 24, 36, 48 dan 60 jam menghasilkan produktivitas volumetrik tertinggi yaitu 1,13 g asam laktat/l.jam.

Hua Li Ping *et al.* (2005) melakukan pengkajian fermentasi asam laktat dengan menggunakan jamur *R. oryzae* dan *R. arrhizus* dengan media limbah industri pengolahan kentang dalam reaktor batch (*shaker flask*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi dengan konsentrasi starch mendekati 20 g/l, pH 6,0 dan suhu 30⁰C merupakan kondisi yang mendukung untuk proses sakarifikasi starch dan fermentasi asam laktat, dengan perolehan asam laktat 0,87-0,97 g/g starch bersamaan dengan pembentukan biomassa 1,5-2,0 g/l selama proses fermentasi 36 jam. *Rhizopus arrhizus* memiliki kemampuan lebih tinggi memproduksi asam laktat, sedangkan *Rhizopus oryzae* memiliki kemampuan lebih tinggi dalam membentuk biomassa pada kondisi operasi yang sama.

Oda Yuji *et al.* (2002) menguji kemampuan tiga puluh delapan strain dari jamur *Rhizopus oryzae* dalam menghasilkan asam laktat pada media bubur kentang dalam reaktor batch (*shaker flask*). Hasil penelitian menunjukkan asam laktat, asam fumarat dan etanol akan terbentuk dengan perbandingan yang berbeda-beda untuk setiap strain yang diuji. Jumlah tertinggi L(+) asam laktat (10mg/g material segar) diperoleh setelah proses fermentasi selama 6 hari oleh jamur *Rhizopus oryzae* IFO 4707.

Tay Abdullatif *et al.* (2002) melakukan fermentasi asam laktat menggunakan jamur *Rhizopus oryzae* dengan sumber karbon glukosa dan tepung jagung dalam reaktor batch berupa *Rotating Fibrous Bed Bioreactor* (RFB), miselia diimmobilisasi pada kain katun. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH 6 dan 90% DO (konsentrasi oksigen terlarut) merupakan kondisi optimum. Perolehan asam laktat dan produktivitas tinggi yaitu 90% (w/w) dan 2,5 g/l.jam (467 g/jam.m²) untuk substrat glukosa dengan fermentasi batch. Jika digunakan tepung jagung sebagai substrat, perolehan asam laktat mendekati 100% (w/w) dan produktivitas 1,65 g/l.jam (300 g/Jam.m²). Konsentrasi asam laktat tertinggi untuk fermentasi batch adalah 127 g/l. Fermentasi sel terimobilisasi dalam RFB menghasilkan cairan fermentasi yang bebas sel dan memberikan beberapa keuntungan dibandingkan fermentasi konvensional. Tanpa proses immobilisasi miselia tumbuh disemua titik dalam fermentor dan menyebabkan masalah khusus dalam pengendalian reaktor sehingga akan menurunkan produktivitas asam laktat.

Hartono Liesbetini *et al.* (2005) melakukan kajian tentang fermentasi asam laktat menggunakan jamur *Rhizopus oryzae* dengan media hidrolisat pati dilakukan dalam reaktor batch (*shaker flask*). Hasil penelitian menunjukkan laju pertumbuhan spesifik *Rhizopus oryzae* sebesar 0,15/ jam dan perolehan asam laktat tertinggi 12,44 g/l. pada jam ke 72. Fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* pada labu kocok dengan substrat yang sama pada konsentrasi gula total 12,14 dan 16% dengan sumber nitrogen ammonium sulfat dan urea. Media dengan konsentrasi gula total 14% dan sumber nitrogen ammonium sulfat dengan waktu fermentasi 7 hari menghasilkan laju pertumbuhan spesifik 0,686/hari dan perolehan asam laktat sebesar 116,13 g/l.

Ruengruglikit C *et al.* (2002) melakukan fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* dengan media tongkol jagung dalam reaktor batch (*shaker*

flask). Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi CaCO_3 , tongkol jagung dan Rapidase Pomaliq sangat mempengaruhi produksi asam laktat. Di bawah kondisi optimal (0,2 g/100 ml CaCO_3 , 5 g/100 ml tongkol jagung dan 0,2 ml/100 ml Rapidase Pomaliq), perolehan asam laktat mendekati 310 g/ kg tongkol jagung kering setelah 48 jam waktu fermentasi.

Purwoko Tjahyadi *et al.* (2004) melakukan penelitian fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* dalam reaktor batch (*shaker flask*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan biomassa dan produksi asam laktat maksimum diperoleh pada media yang ditambahkan CaCO_3 . Produktivitas asam laktat dan efisiensinya adalah 28,89 g/l dan 25,81% untuk penambahan CaCO_3 di awal proses fermentasi dan 36,73 g/l dan 32,11% pada media yang ditambahkan 5% CaCO_3 setelah proses fermentasi satu hari.

Koide Mitchiteru *et al.* (2002) melakukan fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* pada media sintesis dengan penambahan karbon aktif dalam batch (*airlift fermentor*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa produktivitas asam laktat dalam *airlift fermentor* akan meningkat dengan penambahan 5 kg/m³ karbon aktif selama proses fermentasi. Karbon aktif lignite menyebabkan pembentukan pellet-pelet kecil miselia *Rhizopus oryzae*, dan meningkatkan produktivitas dari 0,824 kg/m³ (tanpa penambahan karbon aktif) menjadi 1,37 kg/m³. Lebih jauh lagi produktivitas meningkat hingga 1,37 kg/m³ dengan penambahan karbon aktif 20 kg/m³, namun penambahan karbon aktif lebih dari itu menjadi tidak efektif.

Ghofar Abdul *et al.* (2005) melakukan penelitian fermentasi asam laktat oleh bakteri *Streptococcus bovis* pada media fermentasi bubur ubi kayu dan limbah cair tahu dalam reaktor batch. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi asam laktat yang diperoleh dari media produksi bubur ubi kayu dan limbah cair tahu hanya 75% dari konsentrasi asam laktat yang diperoleh media

sintetik standar. Laju pertumbuhan spesifik dan total yield media produksi bubur ubi kayu dan limbah cair tahu berkisar antara $1/4 - 1/3$ dan antara $1/5 - 1/4$.

1.2 Identifikasi Masalah

Penelitian fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* telah dilakukan dalam media produksi berupa limbah cair industri pengolahan makanan berbahan baku kentang, jagung, gandum dan nenas. Limbah industri tersebut ternyata sangat potensial jika digunakan sebagai media fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae*. Industri pengolahan makanan di Indonesia, seperti industri pembuatan tahu cukup banyak jumlahnya. Limbah cair tahu diperkirakan memiliki komposisi nutrisi yang cukup untuk mendukung proses fermentasi asam laktat. Sejauh ini belum ditemukan penelitian yang memanfaatkan limbah cair tahu sebagai media produksi fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae*, sehingga penelitian ini akan difokuskan pada masalah tersebut.

Pengaruh berbagai variabel proses seperti pH, waktu fermentasi, aerasi dan pengadukan, suhu, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi substrat awal pada fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* telah dipelajari oleh peneliti terdahulu. Pengaruh variabel proses tersebut dipelajari dalam media sintetik. Penelitian ini akan mempelajari pengaruh konsentrasi substrat awal dan laju pengadukan terhadap proses fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* pada media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu.

Performance (unjuk kerja) proses fermentasi dipelajari melalui kinetika pertumbuhan biomassa, penggunaan substrat dan pembentukan produk, dituangkan dalam bentuk parameter kinetika. Nilai parameter kinetika ini

spesifik untuk jenis mikroorganisma, substrat yang digunakan dan produk yang dihasilkan. Kinetika proses fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* telah dipelajari dalam media sintetik dan media limbah cair industri pengolahan makanan berbahan baku kentang, jagung, gandum dan nenas. Saat ini belum ditemukan data parameter kinetika asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* dalam media fermentasi limbah cair tahu, sehingga penelitian ini akan membahas masalah tersebut.

1.3 Perumusan Masalah

Limbah cair tahu memiliki kadar nitrogen yang cukup tinggi, namun kandungan karbonnya rendah. Sehingga sumber karbon harus ditambahkan untuk mengimbangi dan memaksimalkan penggunaan nitrogen dalam limbah cair tahu untuk pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat yang maksimal. Sumber karbon yang ditambahkan berbentuk *starch*/amilum yang berharga murah dan mudah diperoleh. Tepung yang memiliki kriteria tersebut adalah tepung tapioka. Rasio C/N yang optimum untuk fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* adalah 3.5 - 5 (Jin Bo *et al.*, 2005). Variasi rasio C/N yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah 1,6; 2,4; 3,2 dan 4, sehingga perbandingan antara berat tepung tapioka terhadap volume limbah cair tahu adalah 20, 30, 40 dan 50 g/l. Variabel yang dibuat tetap adalah waktu fermentasi, umur dan volume inokulum, pH, suhu, perbandingan volume media fermentasi terhadap volume reaktor, pengadukan dan jumlah CaCO_3 yang ditambahkan.

Laju pengadukan berkaitan erat dengan aerasi dan transfer oksigen dalam media fermentasi. Berbagai jurnal penelitian mengusulkan laju pengadukan untuk fermentasi asam laktat pada range 150-200 rpm. Variasi laju pengadukan yang digunakan adalah 100, 150, 200 dan 250 rpm. Variabel yang

dibuat tetap adalah waktu fermentasi, umur dan volume inokulum, pH, suhu, perbandingan volume media fermentasi terhadap volume reaktor, jumlah CaCO_3 yang ditambahkan dan rasio C/N optimum yang diperoleh pada tahap penelitian sebelumnya.

Penelitian ini akan mempelajari pengaruh dan kondisi optimum variabel proses rasio C/N dan laju pengadukan terhadap proses fermentasi asam laktat melalui profil, parameter kinetika dan optimasi dengan *Response Surface Methods*.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mempelajari karakteristik dari tepung tapioka dan limbah cair tahu sebagai media fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae*.
2. Mempelajari pengaruh rasio C/N dan laju pengadukan terhadap pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat.
3. Menentukan parameter kinetika proses fermentasi asam laktat yaitu laju pertumbuhan spesifik (μ), laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m), tetapan kejenuhan substrat (K_s) dan konstanta penggunaan substrat (k_3), perolehan/yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$) dan perolehan/yield produk terhadap substrat ($Y_{P/S}$).
4. Menentukan konsentrasi amilum dan laju pengadukan optimum untuk pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini memberikan manfaat teoritik dan aplikatif berupa :

1. Data parameter kinetika fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* dalam media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu

yang dapat digunakan untuk perancangan proses dan reaktor skala besar.

2. Penggunaan campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu akan mengurangi biaya produksi asam laktat dalam skala industri.
3. Pemanfaatan limbah cair tahu akan mengurangi pencemaran lingkungan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Laktat

Asam laktat (*2-hydroxypropanoic acid*) adalah asam hidroksi organik yang tersebar secara luas di alam. Asam laktat memiliki tingkat keasaman yang sederhana dibandingkan bahan pengasam makanan yang lain, rasa dan baunya tidak tajam dan dinyatakan sebagai bahan pengawet yang aman (GRAS, *generally regarded as safe*) oleh FDA di US (Vickroy, 1985). Karakteristik tersebut menyebabkan asam laktat sesuai untuk mengawetkan susu, daging, telur dan makanan laut. Industri makanan ternak menggunakan ammonium laktat sebagai supplement nitrogen karena terbukti lebih baik dibandingkan dengan sumber nitrogen non-protein lain (J.M Dominguez *et al.*, 2005).

2.1.1 Aplikasi dan penggunaan asam laktat

Asam laktat diperdagangkan dalam berbagai kualitas (grade) yang berbeda yaitu *technical*, *food* dan *pharmaceutical grades*. Konsentrasi asam laktat biasanya berkisar antara 50 – 88%. Kualitas asam laktat semakin tinggi jika kadar pengotor seperti gula, logam, klorida, sulfat dan abu semakin kecil. Asam laktat yang dihasilkan dari proses fermentasi berwarna kuning dan biasanya mengandung residu dari gula dan sumber nitrogen. Sifat korosif dari larutan asam laktat diatasi dengan mengkonversi asam laktat ke dalam bentuk garamnya seperti *calcium lactate* (Vickroy, 1985).

Garam kalsium dari asam laktat diproduksi dalam bentuk *granular* atau serbuk (*powder*). *Calcium lactate trihydrate*, sebagai sumber kalsium diet dan zat pembeku darah pada kasus pendarahan dan pembedahan. *Calcium lactate* digunakan sebagai bahan penolong industri antibiotik dan berfungsi sebagai

buffer pada sediaan farmasi. Plastik *biodegradable* berbahan baku asam laktat digunakan sebagai benang bedah (*sutures*) yang tidak perlu diambil kembali. Selain itu sedang dikembangkan pula *biodegradable implant* untuk patah tulang dan luka-luka. *Calcium lactate* dipergunakan pula di dalam pembuatan *baking powder* (Vickroy, 1985).

Asam laktat dalam bentuk ester (*stearoyl-2-lactylates*, *glyceryl lactostearate*, *glyceryl lactopalmitate*) digunakan sebagai bahan pengemulsi makanan yang dipanggang pada industri roti dan biskuit untuk mendapatkan tekstur yang lembut. Bahan pengemulsi tersebut membutuhkan bahan baku asam laktat yang stabil terhadap panas (Narayanan, 2004).

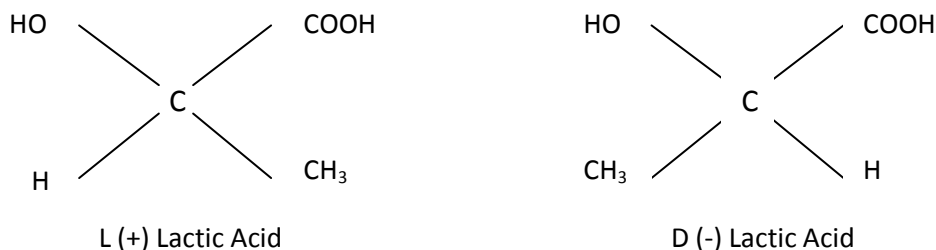
Asam laktat sebagian besar digunakan sebagai bahan tambah makanan. Asam laktat digunakan sebagai bahan perisa asam makanan, memiliki rasa asam yang sederhana, bau dan rasanya tidak tajam. Kombinasi asam laktat dengan asam propionat atau asam asetat digunakan sebagai bahan pengawet. Harga asam laktat lebih mahal dibandingkan perisa asam makanan yang lain seperti asam sitrat, asam asetat, asam fosfat, dan asam propionate, namun asam laktat dipilih karena tidak mempengaruhi rasa asli dari makanan. Asam laktat digunakan pada pengolahan bahan pangan yang diasinkan, keju, cake, saus salad, minuman ringan, salami, selai dan jelly (Vickroy, 1985).

Asam laktat dengan kualitas *technical grades* digunakan oleh industri pembuatan *cellophane* sebagai pengontrol pH pada proses pelapisan film. Asam laktat dapat direaksikan dengan alkohol dan asam sebagai *plasticizers* pada pembuatan polyester dan resin phenol-formaldehid. Asam laktat digunakan pada industri karet, logam dan tekstil. Pada industri penyamakan kulit asam laktat telah banyak digunakan sebagai pengganti asam sulfat dan asam formiat. Asam laktat juga dipakai pada industri pestisida, herbisida dan fungisida (Vickroy, 1985).

2.1.2 Sifat kimiawi asam laktat

Asam laktat pertama diisolasi dari susu asam oleh Scheele pada tahun 1780. (Narayanan, 2004). Asam laktat merupakan asam karboksilat dengan rumus molekul $C_3H_6O_3$ ($CH_3\cdot CHOH\cdot COOH$). Asam laktat memiliki gugus hidroksil berdekatan dengan gugus asam karboksilat, sehingga membentuk sebuah *alpha hydroxyl acid* (AHA).. Asam laktat memiliki tiga karbon organik, satu atom karbon merupakan bagian dari asam atau grup karboksil, atom karbon lain merupakan bagian dari grup methyl atau hidrokarbon, dan atom karbon yang di pusat memiliki sebuah gugus alkohol. Asam laktat dalam larutan dapat melepaskan sebuah proton dari gugus asam, menghasilkan ion *lactate* $CH_3(OH)COO^-$ (Narayanan, 2004).

Asam laktat merupakan asam *chiral* (asam asimetris) yang memiliki dua isomer optikal yaitu *L(+)-lactic acid* dan *D(-)-lactic acid*. Hanya asam laktat jenis *L(+)-lactic acid* (*sarcolactic acid*, *paralactic acid*) ditemukan dalam tubuh manusia.. *L(+)-lactic acid* dan *D(-)-lactic acid* ditemukan di hampir semua sistem biologis (Jin Bo *et al.*, 2005). Kedua bentuk isomer asam laktat tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Dua jenis isomer optikal asam laktat (Narayanan, 2004)

Asam laktat dengan tingkat kemurnian tinggi dapat membentuk kristal bening *monoclinic*. Asam laktat larut dalam air, alkohol, eter tapi tidak larut dalam khloroform. Asam laktat termasuk asam lemah dan memiliki sifat volatilitas yang rendah. Asam laktat dapat membentuk *cyclic dimer (lactide)* atau polimer linier dengan rumus kimia umum $\text{H}[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CO}]_n\text{OH}$. Asam laktat dapat bereaksi seperti asam organik lain sebaik alkohol organik dan dapat terlibat pada berbagai tipe reaksi kimia (Vickroy, 1985).

2.1.3 Proses produksi asam laktat

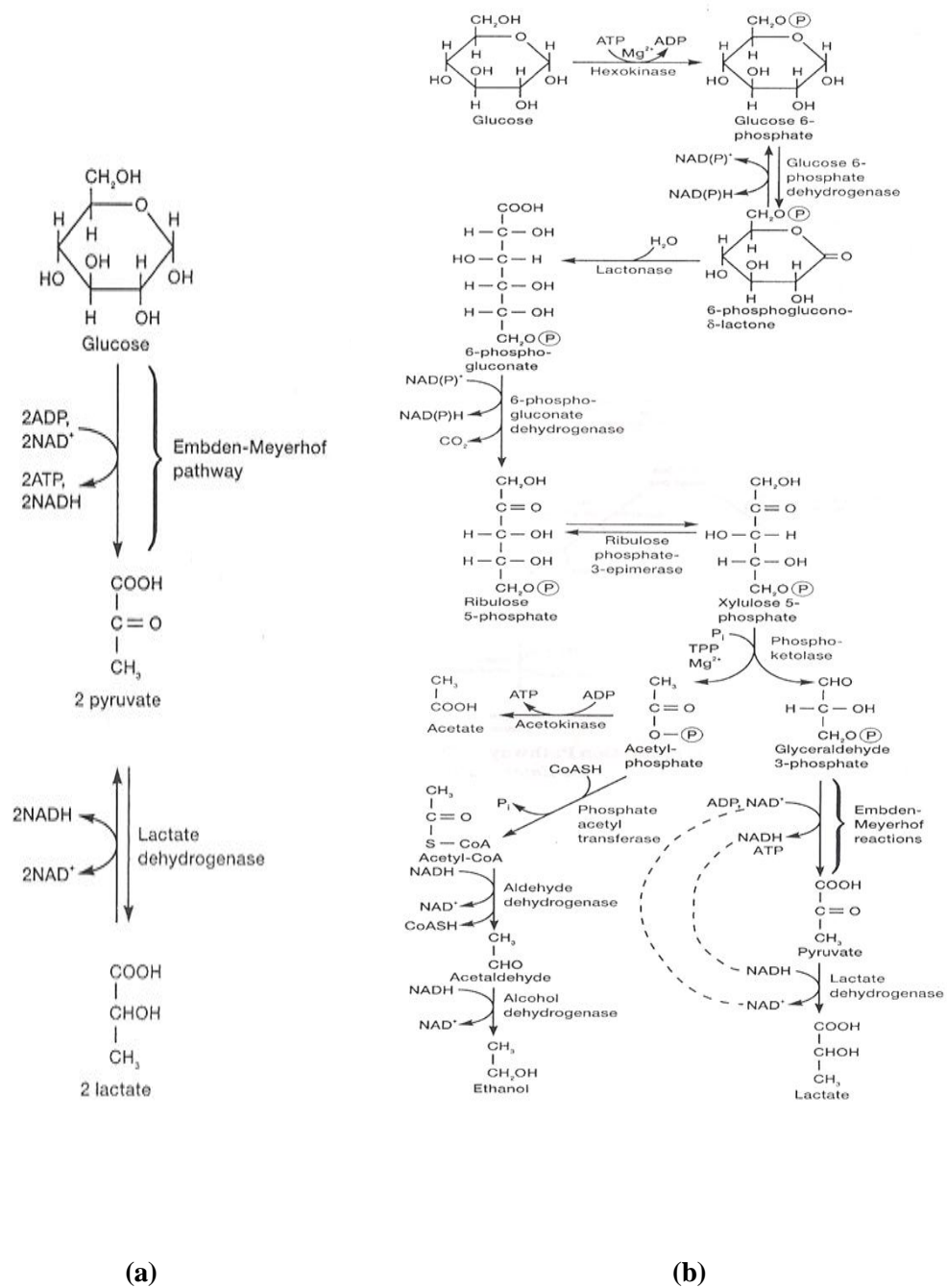
Asam laktat dapat diproduksi dengan dua cara yaitu secara sintesa kimia dan fermentasi karbohidrat. Bahan baku untuk proses produksi asam laktat secara sintesa kimia adalah *lactonitrile*. *Hydrogen cyanide* direaksikan dengan *acetaldehyde* akan menghasilkan *lactonitrile*. Reaksi ini terjadi pada fasa cair pada tekanan atmosfer yang cukup tinggi. *Lactonitrile* mentah yang dihasilkan dipisahkan dan dimurnikan dengan proses distilasi, kemudian dihidrolisa oleh HCl atau H_2SO_4 pekat sehingga diperoleh asam laktat dan garam ammonium. Asam laktat dan *methanol* kemudian diesterifikasi menjadi *methyl lactate*, kemudian dipisahkan dan dimurnikan dengan proses distilasi. *Methyl lactate* dihidrolisa oleh air dalam kondisi asam sehingga dihasilkan asam laktat dan *methanol*. Proses sintesa kimia menghasilkan campuran dua isomer asam laktat. Dua perusahaan besar yaitu Musashino, Japan dan Sterling Chemicals Inc. USA menggunakan teknologi tersebut. Berbagai metoda sintesa kimia lain yang menghasilkan asam laktat adalah penguraian gula dengan katalis, oksidasi *propylene glycol*, reaksi antara *acetaldehyde*, *carbon monoxide* dan air pada suhu dan tekanan tinggi, dan *hidrolisis chloropropionic acid* (Narayanan, 2004).

Asam laktat dihasilkan pula dari proses fermentasi dengan bahan baku gula atau amilum. Jenis mikroorganisma yang menghasilkan asam laktat adalah golongan bakteri dan jamur. Secara umum karakteristik industri yang menggunakan mikroorganisma sebagai agen perubah adalah kemampuan dan kecepatan mengfermentasi bahan baku yang murah dengan penambahan komponen nitrogen serendah mungkin. Mikroorganisma yang dipilih memiliki kriteria mampu menghasilkan asam laktat dengan perolehan yang tinggi, pada kondisi pH yang rendah dan temperatur yang tinggi, menghasilkan sejumlah kecil massa dan produk samping lain (Vickroy, 1985).

2.2 Fermentasi Asam Laktat

Fermentasi asam laktat telah banyak dipelajari oleh peneliti terdahulu dengan menggunakan berbagai jenis mikroorganisme, sumber karbon, sumber nitrogen, dan kondisi operasi (pH, suhu, volume dan konsentrasi inokulum). Jenis mikroorganisme yang menghasilkan asam laktat adalah bakteri (*Lactobacillus*, *Streptococcus* dan *Pediococcus*) dan jamur (*Rhizopus*).

Jenis bakteri penghasil asam laktat dapat digolongkan sebagai *homofermentative lactic acid bacteria* karena pada proses metabolismenya mampu menghasilkan asam laktat dalam jumlah besar, sel dan sedikit produk samping, melalui *Embden-Meyerhof pathway*. *Rhizopus* digolongkan sebagai *heterofermentative lactic acid*. Sel *Rhizopus* dapat menghasilkan 1,5 mol asam laktat dari 1 mol glukosa dalam kondisi aerobik dan sisanya diubah menjadi miselia, *glycerol*, *fumarate* atau etanol [Skory, 2000]. Jalur metabolisme *homofermentative lactic acid* dan *heterofermentative lactic acid* disajikan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Jalur metabolisme *homofermentative lactic acid* (a) dan *heterofermentative lactic acid* (b) (Bailey and Ollis, 1987)

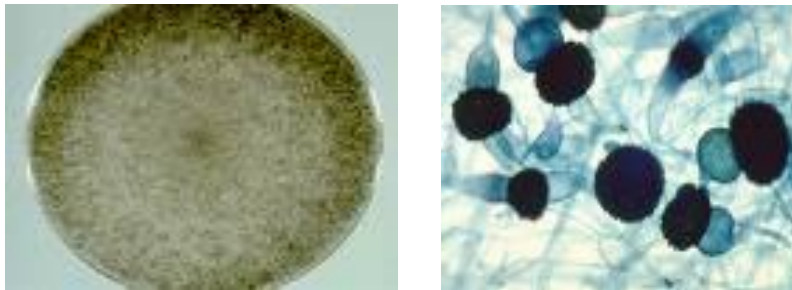
2.2.1 Jenis mikroorganisma

Mikroorganisma dapat digolongkan berdasarkan sumber nutrisi dan sumber energi yang digunakannya :

- Mikroba *autotroph*, yaitu jenis mikroba yang mensintesa semua struktur kimia kompleks dalam selnya (protein, lemak, karbohidrat, vitamin, dinding sel, asam nukleat dll) dari karbondioksida di atmosfer atau senyawa karbonat dan beberapa senyawa inorganik sederhana seperti *ammonium sulfate*, *magnesium sulfate*, *ferric chloride*, *potassium phosphate* dan *sodium chloride*. Mikroba *autotroph* dapat dibagi lagi berdasarkan kemampuannya menggunakan sumber energi dari cahaya (*phototrophs*) dan dari reaksi kimia (*chemotrophs*).
- Mikroba *heterotroph*, yaitu jenis mikroba yang menggunakan senyawa organik baik sebagai sumber energi atau materi organik untuk mensintesa komponen-komponen sel.
- *Lithotroph* adalah jenis mikroba yang menggunakan karbon dioksida sebagai satu-satunya sumber karbon dan memperoleh energi dari cahaya (*photolithotroph*) atau dari oksidasi substrat organik (*chemolithotroph*). *Organotroph* adalah mikroba yang memilih substrat organik yang mudah teroksidasi dan menggunakan energi cahaya untuk mengasimilasi karbondioksida atau senyawa organik (*photoorganotroph*) atau mengoksidasi/fermentasi senyawa organik (*chemmoorganotroph*) untuk tumbuh. Jenis mikroba yang berperan penting dalam industri fermentasi seperti ragi, jamur atau *actinomycetes* kebanyakan berasal dari golongan *chemmoorganotroph* (Greasham, 1993).

Fermentasi asam laktat oleh bakteri telah banyak dikembangkan. Bakteri *Lactobacillus delbreuckii* merupakan bakteri homofermentatif yang mampu menghasilkan asam laktat dalam jumlah cukup besar. Keterbatasan fermentasi bakterial adalah tingginya biaya untuk pretreatment hidrolisis substrat menjadi glukosa, penambahan nutrient spesifik seperti yeast ekstrak dan vitamin-B, pengaturan pH selama proses fermentasi untuk menjaga pertumbuhan bakteri, recovery dan purifikasi asam laktat pada proses hilir (Jin Bo *et al.*, 2005). Penambahan yeast ekstrak 15% pada kultur *Lactobacillus delbreuckii* menghasilkan perolehan asam laktat tertinggi (Busairi and Mat HB, 2005).

Rhizopus oryzae termasuk dalam kelompok mikroba *chemmoorganotroph*. Genus *Rhizopus* diklasifikasikan di bawah famili *Mucoraceae*, ordo *Mucorales* dan phylum *Rhizopus oryzae*. Bentuk koloni dan struktur multiselular *Rhizopus oryzae* ditunjukkan oleh Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Bentuk koloni dan struktur multiselular *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae ditemukan pada permukaan sayuran yang membusuk, buah-buahan dan bijinya, biji-bijian dan roti berjamur. Genus *Rhizopus* memiliki stolon dan rhizoid yang berpigmen, *sporangiospores* single atau berkelompok dihasilkan oleh *nodes* yang terdapat diujung rhizoid. Koloni *Rhizopus oryzae* cepat sekali tumbuh dan menutupi permukaan agar padat

dengan struktur seperti kapas, awalnya berwarna putih kemudian menjadi abu-abu atau kekuningan.

Jamur *Rhizopus oryzae* merupakan spesies yang potensial untuk menghasilkan asam laktat. Fermentasi asam laktat dengan menggunakan *Rhizopus* lebih menguntungkan karena dapat menekan biaya untuk proses pretreatment bahan baku dan penyediaan komponen nitrogen kompleks seperti yeast ekstrak. *Rhizopus* memiliki sifat *amylolytic* karena itu mampu menghasilkan asam laktat dari berbagai material *saccharidic* seperti tepung kentang tanpa proses *sacharifikasi* terlebih dahulu (J.M Dominguez *et al.*, 1999).

Rhizopus memiliki ketahanan cukup tinggi terhadap konsentrasi substrat dibandingkan jenis bakteri. Konsentrasi glukosa melebihi 50 g/l pada kultur bakteri akan menurunkan pertumbuhan karena terjadi penghambatan pertumbuhan oleh substrat (dehidrasi sel). Konsentrasi glukosa yang lebih tinggi (di atas 200 g/l) dapat ditoleransi oleh ragi dan jamur (Shuler and Kargi, 1992).

Rhizopus oryzae memiliki kemampuan melakukan proses sakarifikasi dan fermentasi secara berkesinambungan (*SSF, Simultaneous Saccharification and Fermentation*) dalam satu tahap. Jamur tersebut memiliki kapasitas metabolik dan kemampuan enzimatik yang tinggi untuk memanfaatkan sumber karbon dalam bentuk polisakarida (pati) untuk menghasilkan asam laktat, sehingga faktor penghambatan oleh substrat dapat dihindari. Selain menghasilkan asam laktat, dalam media kultivasi yang sama juga dihasilkan biomassa *Rhizopus oryzae* yang memiliki kandungan protein cukup tinggi berkisar 40-45%. *Rhizopus arrhizus* 36017 mampu merombak 20 – 40 g/l gula total menjadi asam laktat dengan laju konversi *starch* dan gula 84-95% dan 93-97%. *Rhizopus oryzae* 2062 menunjukkan kemampuan menghasilkan biomassa

15-20 g/l bersamaan dengan produksi asam laktat sebesar 20 g/l . Sehingga produksi asam laktat dapat digabungkan dengan produksi biomassa jamur dengan bahan baku yang sama. *Rhizopus oryzae* NRRL 395 menghasilkan asam laktat 60-80 g/l yang diperoleh selama 3 hari dalam fermentasi batch dengan yield 65-78% (J.M Dominguez *et al.*, 1999).

2.2.2 Media fermentasi

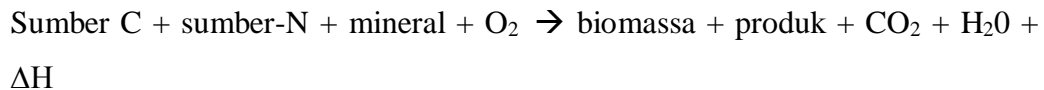
Berbagai media fermentasi telah dikembangkan untuk menghasilkan formulasi media fermentasi yang tepat untuk suatu proses fermentasi dengan mikroorganisma tertentu. Formulasi media fermentasi skala kecil relatif lebih mudah dilakukan dengan penggunaan senyawa-senyawa murni. Namun hal tersebut tidak cocok untuk media fermentasi skala besar (media produksi). Formula media fermentasi yang tepat tidak akan dipublikasikan tetapi dijadikan asset perusahaan yang berharga, Beberapa kriteria pemilihan media fermentasi adalah sebagai berikut :

- Menghasilkan perolehan/yield biomassa dan produk yang maksimum per gram substrat yang digunakan.
- Menghasilkan konsentrasi biomassa dan produk yang maksimum.
- Menghasilkan kecepatan pembentukan produk yang maksimum.
- Menghasilkan perolehan/yield yang minimum untuk produk yang tidak diinginkan.
- Murah, memiliki kualitas yang berkesinambungan dan tersedia sepanjang tahun.
- Mudah dalam penanganan selama proses, terutama untuk pengadukan, aerasi, ekstraksi, purifikasi dan penanganan limbah (Stanbury and Whitaker, 1984).

Media fermentasi harus mengandung komponen-komponen yang diperlukan untuk pertumbuhan sel, pembentukan metabolit dan menyediakan energi yang cukup untuk biosintesa dan pemeliharaan sel. Nutrisi yang diperlukan oleh mikroorganisma diklasifikasikan sebagai berikut :

- *Macronutrient*, diperlukan dalam konsentrasi lebih besar dari 10^{-4} M. C, N, S, P, Mg^{+2} dan K^{+} termasuk *macronutrien*.
- *Micronutrient*, diperlukan dalam konsentrasi kurang dari 10^{-4} M. Trace element seperti Mo^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Na^{+} , vitamin, hormon pertumbuhan dan *metabolic precursor* termasuk *micronutrient*

Persamaan stokiometri yang menggambarkan penggunaan nutrisi untuk pertumbuhan biomassa dan pembentukan sel adalah sebagai berikut :



Panduan awal untuk menyusun formula suatu media fermentasi adalah berdasarkan komposisi unsur-unsur penyusun suatu sel. Komposisi unsur-unsur mikroorganisma ditunjukkan oleh Tabel 2.1. Pada media kultivasi bakteri, unsur P dan K diberikan dalam jumlah berlebih, tetapi unsur Zn dan Cu diberikan dalam jumlah terbatas. P diberikan berlebih pada berbagai media berfungsi untuk

Tabel 2.1 Komposisi unsur-unsur dalam sel bakteri, yeast dan jamur (% berat kering) (Stanbury and Whitaker, 1984)

Element	Bacteria (Luria, 1960; Herbert 1976; Aiba et al., 1973)	Yeasts (Aiba et al., 1973; Herbert, 1976)	Fungi (Lilly, 1965; Aiba et al., 1973)
Carbon	50-53	45-50	40-63

Hydrogen	7	7	-
Nitrogen	12-15	7.5-11	7-10
Phosphorus	2.0-3.0	0.8-2.6	0.4-4.5
Sulphur	0.2-1.0	0.01-0.24	0.1-0.5
Potassium	1.0-4.5	1.0-4.0	0.2-2.5
Sodium	0.5-1.0	0.01-0.1	0.02-0.5
Calcium	0.01-1.1	0.1-0.3	0.1-1.4
Magnesium	0.1-0.5	0.1-0.5	0.1-0.5
Chloride	0.5	-	-
Iron	0.02-0.2	0.01-0.5	0.1-0.2

meningkatkan *buffering capacity*. Beberapa jenis mikroba tidak dapat mensintesa nutrisi spesifik seperti asam amino, vitamin dan nukleotida, sehingga faktor pertumbuhan yang spesifik harus ditambahkan pada media fermentasi baik dalam bentuk senyawa murni atau senyawa kompleks (Stanbury and Whitaker, 1984).

2.2.2.1 Macronutrient

Sumber karbon akan dirombak dan digunakan untuk membangun massa sel dan membentuk produk. Glukosa merupakan sumber karbon yang umum digunakan untuk proses fermentasi, namun saat ini telah dikembangkan berbagai senyawa organik alami seperti *glycerol*, *lactose* dsb. Konsentrasi glukosa di dalam media fermentasi harus dipertimbangkan dengan seksama. Konsentrasi glukosa melebihi 50 g/l pada kultur bakteri akan menurunkan pertumbuhan karena terjadi dehidrasi sel. Konsentrasi glukosa yang lebih tinggi (di atas 200 g/l) dapat ditoleransi oleh ragi dan jamur (Stanbury and Whitaker, 1984). Namun pada konsentrasi tertentu, sumber karbon dan katabolit karbon dapat menghambat satu atau beberapa enzim yang berperan dalam proses

pembentukan produk. Salah satu pendekatan untuk mencegah penghambatan tersebut adalah dengan memberikan sumber karbon secara terus-menerus pada konsentrasi di bawah konsentrasi penghambatan. Sumber karbon yang banyak digunakan untuk media produksi adalah molase tebu, molase beet, biji-bijian, tepung, sukrosa, laktosa, whey, minyak nabati, metana, methanol dan n-alkana (Shuler and Kargi, 1992).

Nitrogen dalam sel merupakan komponen penyusun protein sel dan asam nukleat. Nitrogen organik maupun anorganik dapat digunakan dalam proses fermentasi. Sumber nitrogen anorganik adalah garam ammonium (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3) dan urea. Ammonium sulfat menghasilkan kondisi asam karena ion ammonium yang dikonsumsi akan melepaskan asam bebas. *Nitrat reductase* adalah enzim yang mengkatalisa konversi nitrat menjadi ion ammonium. Proses ini akan terhambat dengan adanya ammonia. Sehingga ammonia atau ion ammonium dipilih sebagai sumber nitrogen anorganik. Ion ammonium dalam kultur jamur akan menghambat penyerapan asam amino. Protein, peptide dan asam amino adalah dua jenis nitrogen organik. Nitrogen organik dapat pula berupa senyawa nitrogen yang kompleks seperti *corn steep liquor*, kacang kedelai, kacang tanah, yeast ekstrak, olahan ikan, dan limbah pemotongan hewan. Nitrogen organik menghasilkan pertumbuhan biomassa lebih cepat dibandingkan nitrogen anorganik (Shuler and Kargi, 1992). Penambahan nutrisi seperti nitrogen dan fosfor dan keberadaan nutrisi lain pada konsentrasi lebih tinggi memiliki efek positif pada produksi asam laktat secara bakterial (Jin Bo *et al.*, 2005).

Tipe dan konsentrasi sumber nitrogen akan mempengaruhi fermentasi asam laktat. Yeast ekstrak dan pepton secara nyata menghasilkan pertumbuhan sel *Rhizopus oryzae* lebih tinggi dibandingkan ammonium sulfat dan urea.

Penambahan sumber nitrogen 1-5 g/l akan meningkatkan 8-14% konsentrasi asam laktat dan laju konversi karbon (Jin Bo *et al.*, 2005).

Phosphorus berada dalam asam nukleat dan dinding sel. Garam organik fosfat seperti KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 merupakan bentuk umum dari garam fosfat. *Phosphorus* adalah elemen kunci dalam pengendalian metabolisme sel. Fosfat inorganik dapat menekan sintesa beberapa metabolit sekunder. Konsentrasi fosfat kurang dari 1mM akan mendukung pembentukan metabolit sekunder seperti antibiotik. Fosfat dapat menekan enzim *p-aminobenzoic acid synthetase* dalam biosintesa *candicidin* pada *Streptomyces griseus* (Shuler and Kargi, 1992).

Sulfur berada dalam protein sel dan beberapa koenzim. Garam sulfat seperti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ merupakan sumber sulfur. Sulfur yang mengandung asam amino juga dapat digunakan sebagai sumber sulfur. Mikroba autotroph menggunakan S^{2-} dan S^0 sebagai sumber energi (Shuler and Kargi, 1992).

Potassium berfungsi sebagai ko-faktor beberapa enzim dan dibutuhkan pada metabolisme karbohidrat. Bentuk potassium yang umum digunakan adalah K_3PO_4 , KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 (Shuler and Kargi, 1992).

Magnesium merupakan ko-faktor untuk beberapa enzim dan berada dalam dinding sel dan membran. Ribosome sangat membutuhkan ion Mg^{2+} . Magnesium umumnya digunakan dalam bentuk $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ atau MgCl_2 (Shuler and Kargi, 1992).

2.2.2.2 Micronutrient

Trace element merupakan nutrisi esensial. Kekurangan *trace element* akan memperpanjang fase lag (adaptasi mikroba) dan dapat menurunkan laju spesifik pertumbuhan dan yield. *Micronutrient* dapat diklasifikasikan dalam tiga kategori.

- *Trace element* yang dibutuhkan secara umum seperti Fe, Zn dan Mn. Fe berada dalam *ferredoxin* dan *cytochrome*, merupakan kofaktor yang penting. Fe merupakan pengendali pada berbagai proses fermentasi. Konsentrasi Fe mengatur produksi penicillin oleh *Penicillium chrysogenum*, pembatasan konsentrasi Fe dibutuhkan untuk memicu ekresi *riboflavin* oleh *Ashbya gossypii*. Zinc (Zn) adalah kofaktor beberapa enzim dan pengendali proses fermentasi seperti penicillin. Mangan (Mn) adalah kofaktor enzim dan pengendali pembentukan metabolit sekunder dan ekresi metabolit primer
- *Trace element* yang dibutuhkan untuk kondisi pertumbuhan yang spesifik seperti Cu, Co, Mo, Ca, Na, Cl, Ni dan Se
- *Trace element* yang kadang-kadang dibutuhkan seperti B, Al, Si, Cr, Sn, Be dsb. Elemen tersebut dibutuhkan pada konsentrasi kurang dari 10^{-6} M dan bersifat toksik pada konsentrasi lebih tinggi seperti 10^{-4} (Stanbury and Whitaker, 1984).

Setiap sistem metabolit sekunder memiliki hubungan yang linier dengan konsentrasi metal “kunci “. Hubungan linier ini tidak dapat diterapkan untuk logam yang bersifat racun pada mikroba. Pengaruh *trace metal* terhadap yield beberapa metabolit primer atau sekunder lebih besar dibandingkan terhadap pertumbuhan mikroba (Shuler and Kargi, 1992).

2.2.3 Media pertumbuhan dan media produksi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae*

Komposisi media untuk menumbuhkan miselia jamur dan untuk produksi asam laktat berbeda. Media yang dapat mendukung pertumbuhan terdiri dari glukosa 80g/l, yeast ekstrak 48 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,34 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,042 g/l, *sodium acetate* 1,23 g/l dan K_2PO_4

0,062 g/l . Jika densitas sel telah tercapai maka dipindahkan dalam media produksi yang mendukung untuk pembentukan asam laktat. Media fermentasi dengan sumber nitrogen yang terbatas akan menghambat pertumbuhan jamur sehingga mendukung pembentukan asam laktat. Pada kondisi tersebut sumber karbon lebih banyak digunakan untuk membentuk asam laktat dibandingkan untuk pertumbuhan. Komposisi media produksi adalah *dextrose* 100 g/l, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,55 g/l, urea 0,03 g/l, *antifoam* 0,03 ml/l dan CaCO_3 49 g/l (US Patent 6849444, 2005).

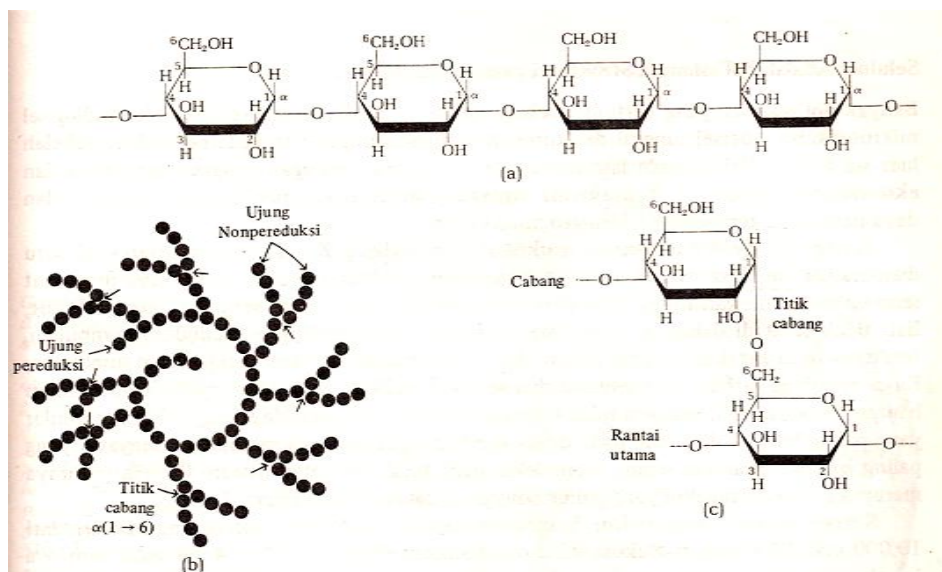
Rentang komposisi media fermentasi untuk produksi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* dengan sumber karbon gula atau *starch* adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1-6 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05-0,25 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02-0,09 g/l, dan KH_2PO_4 0,12-0,6 g/l . Ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen ditambahkan hingga perbandingan C/N mencapai 5, namun produksi asam laktat tertinggi diperoleh pada perbandingan C/N 3,5. Media fermentasi yang miskin kandungan nitrogen dapat menurunkan pertumbuhan biomassa. Penambahan nitrogen lebih kecil dari 5 g/l akan meningkatkan produksi asam laktat terutama untuk jamur (Jin Bo *et al.*, 2005).

Gula dan tepung digunakan secara luas sebagai sumber karbon untuk media produksi asam laktat secara komersial. Berbagai bahan baku dari jenis tepung-tepungan seperti gandum, jagung, kentang, sorghum dan singkong telah banyak diteliti sebagai bahan baku yang potensial untuk produksi asam laktat. Tepung ubi kayu (tapioka) merupakan tepung yang paling murah harganya (sekitar 32-64 US\$/ton) dibandingkan jenis tepung yang lain . Tepung tapioka diperoleh melalui proses ekstraksi pati dari ubi kayu. Komponen terbesar penyusun tepung tapioka adalah amilum (Tjokroadikoesoemo, 1986).

Pati adalah salah satu jenis polisakarida , merupakan cadangan makanan bagi tumbuhan yang disimpan dalam bijian (padi, jagung, gandum), dalam

umbi (ubi kayu, ubi jalar , kentang, talas), dan pada batang (sagu, aren). Pati mengandung dua jenis polimer glukosa yaitu amilosa dan amilopektin. Perbandingan antara amilosa dan amilopektin tergantung pada jenis tumbuhan. Ubi kayu termasuk tumbuhan penghasil pati dengan kandungan amilopektin yang tinggi. Pati dengan kandungan amilopektin yang tinggi sangat tepat digunakan sebagai bahan baku industri. Pati jenis ini sedikit mengandung ISSP (*insoluble starch particles*) ISSP adalah partikel pati yang tersusun dari sejumlah besar amilosa yang membentuk rantai lurus (linier). ISSP dapat dihidrolisis dengan katalis asam (Tjokroadikoesoemo, 1986).

Amilosa terdiri dari rantai unit-unit D-glukosa yang panjang dan tidak bercabang, dihubungkan oleh ikatan $\alpha(1-4)$. Amilosa memiliki berat molekul bervariasi mulai dari beberapa ribu sampai 500.000. Amilopektin memiliki berat molekul yang tinggi dengan rantai yang bercabang. Ikatan glikosidik yang menggabungkan residu glukosa yang berdekatan di dalam rantai amilopektin adalah ikatan $\alpha(1-4)$, tetapi titik percabangan amilopektin merupakan ikatan $\alpha(1-6)$. Ikatan $\alpha(1-6)$ sangat sukar diputuskan, terlebih dengan katalisator asam. Enzim α -amilase, β -amilase dan R-enzim bersama-sama akan memutuskan rantai tersebut pada saat diperlukan (Lehninger, 1988). Struktur molekul pati disajikan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Amilosa dan amilopektin, polisakarida dari pati. (a) Amilosa suatu polimer linier dari unit-unit D-glukosa dalam $\alpha(1-4)$. **(b) Amilopektin**, tiap bulatan menggambarkan satu residu glukosa. Terlihat residu glukosa pada cabang paling luar, yang akan diuraikan oleh α -amilase. Bagian yang paling tengah adalah struktur limit dekstrin yang tertinggal setelah α -amilase melepaskan semua residu glukosa di sebelah luar. Ikatan $\alpha(1-6)$ pada titik-titik cabang (ditunjukkan oleh panah kecil) dipotong oleh $\alpha(1-6)$ glukosidase, jadi membuka pengikat residu D-glukosa lain yang berikatan $\alpha(1-4)$ terhadap aktivitas amilase. **(c) Struktur suatu titik cabang** (Lehninger, 1988).

Limbah cair tahu berasal dari kedelai yang sudah dimasak sehingga protein limbah cair tahu mempunyai nilai biologis yang lebih tinggi dari pada biji kedelai itu sendiri. Bahan-bahan organik yang terdapat dalam limbah cair tahu adalah protein (40-60%), karbohidrat (25-50%) dan lemak (10%). Selain itu dari beberapa hasil penelitian, limbah pengolahan tahu memiliki kadar BOD sekitar 5000-10.000 mg/l dan COD 7000-12.000 mg/l. Komposisi beberapa komponen limbah cair tahu yang diperoleh dari PPRI No. 82 tahun 2001 dapat dilihat pada Tabel 2.2. Komponen nutrisi yang lengkap dari limbah

cair tahu terutama kandungan proteinnya diharapkan sesuai sebagai sumber nitrogen dan mineral lain untuk media fermentasi asam laktat (Rossiana, 2006).

Tabel. 2.2 Komposisi beberapa komponen limbah cair tahu (Rossiana, 2006)

Komponen	Nilai
BOD	354,44 mg/l
Ammonia	3,52 mg/l
Nitrat	5,15 mg/l
Sulfida	77,20 mmg/l
pH	3,63

2.2.4 pH

Konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi penyerapan nutrisi dan aktifitas fisiologis mikroba sehingga mempengaruhi pula pertumbuhan biomassa dan pembentukan produk. Bakteri memiliki pH optimum pertumbuhan pada rentang 6,5 - 7,5 sedangkan ragi dan jamur pada rentang 4,5 – 5,5. pH optimal pertumbuhan tidak selalu sama dengan pH optimal pembentukan produk. Produksi penicillin maksimum oleh *Penicillium chrysogenum* diperoleh pada rentang pH 6,0 – 7,0. Pengendalian pH pada fermentasi dengan reaktor erlemeyer cukup sulit dilakukan. Larutan buffer biasanya digunakan untuk mengendalikan pH pada erlemeyer (Shuler and Kargi, 1992).

Pertumbuhan biomassa *Rhizopus oryzae* dan pembentukan asam laktat memiliki pH optimum yang hampir sama pada range pH 3,5 – 6. Penurunan konsumsi glukosa dan produksi asam laktat terjadi pada pH kurang dari 2. Untuk mencegah penurunan pH dilakukan penambahan CaCO_3 secara berkala. Penambahan CaCO_3 5% di awal proses, dan 3% setelah 24, 36 dan 48 jam

proses fermentasi berlangsung akan meningkatkan produktivitas volumetrik asam laktat (J.M Dominguez *et al.*, 1999; Purwoko *et al.*, 2004).

2.2.5 Suhu

Suhu merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan sel. Berdasarkan suhu optimum, mikroorganisma diklasifikasikan menjadi 3 golongan yaitu (1) *psychrophiles* ($T_{opt} < 20^{\circ}\text{C}$), (2) *mesophiles* ($T_{opt} 20-50^{\circ}\text{C}$), (3) *thermophiles* ($T_{opt} > 50^{\circ}\text{C}$). Setiap penambahan suhu 10°C menuju suhu optimal pertumbuhan, maka laju pertumbuhan meningkat dua kali lipat. Sebaliknya jika berada di atas suhu optimal pertumbuhan maka laju pertumbuhan akan berkurang dan kematian akibat termal mungkin saja terjadi. Suhu juga mempengaruhi pembentukan produk. Suhu optimum untuk pertumbuhan berbeda dengan suhu optimum untuk pembentukan produk (Shuler and Kargi, 1992).

Rhizopus oryzae diklasifikasikan sebagai mikroba *mesophiles*, yang memiliki suhu optimal pertumbuhan $28-46^{\circ}\text{C}$. Strain *Rhizopus oryzae* memiliki suhu optimal pertumbuhan $28-36^{\circ}\text{C}$. Saat ini telah dikembangkan Strain *Rhizopus oryzae* yang mampu melakukan proses fermentasi pada suhu $38-46^{\circ}\text{C}$. Pada suhu tersebut pengendapan *lactate* (*calcium L-lactate*) yang mempengaruhi proses fermentasi dapat dihambat atau dicegah (US Patent 6849444, 2005).

2.2.6 Aerasi

Oksigen merupakan nutrisi kunci untuk mikroba anaerob, biasanya ditemukan sebagai penyusun air selular dan komponen organik. Karbohidrat merupakan sumber oksigen yang baik untuk beberapa mikroba, Mikroba yang mendapatkan energi dari proses respirasi, membutuhkan oksigen sebagai final

oksigen atau *elektron acceptor*. Kelarutan oksigen dalam air sangat rendah (6,99 ppm pada 35⁰C). Transfer oksigen dari udara-permukaan cairan ke media pertumbuhan harus dilakukan secara kontinu untuk memenuhi kebutuhan sebanyak mungkin mikroba yang ada dalam kultur tersebut. Transfer oksigen dalam erlemeyer diperoleh dengan menggoyangkan erlemeyer tersebut, dan dapat ditingkatkan dengan menambahkan *baffle* pada erlemeyer. Volume cairan dalam erlemeyer dikurangi untuk mendapatkan tingkat aerasi yang memadai. Transfer oksigen untuk fermentor diperoleh melalui *sparging* dan pengadukan. Karakteristik media fermentasi dapat mempengaruhi ketersediaan oksigen dalam cairan media.

- Metabolisme substrat, glukosa lebih cepat termetabolisme dibandingkan laktosa atau sukrosa, sehingga jumlah oksigen yang dibutuhkan untuk metabolisme glukosa juga lebih banyak dibandingkan sukrosa dan laktosa. Ketersediaan oksigen dalam cairan fermentasi yang menggunakan glukosa sebagai substrat lebih terbatas karena terus digunakan secara cepat untuk proses metabolisme. Hal tersebut dapat diatasi dengan mengurangi konsentrasi substrat glukosa di awal proses, kemudian ditambahkan secara bertahap selama proses secara kontinu atau semi kontinu. Komposisi media fermentasi juga dapat diubah dengan menggunakan karbohidrat tinggi (laktosa, tepung dll) dan protein yang tidak terlalu cepat termetabolisme.
- *Rheology*, komponen penyusun media fermentasi dapat mempengaruhi viskositas media sehingga akan mempengaruhi aerasi dan pengadukan. Polimer dalam larutan, terutama tepung dan polisakarida lain akan mengubah *rheology* dari kaldu fermentasi. Saat polisakarida diuraikan maka sifat-sifat *rheology* juga akan berubah.

- *Anti foam*, beberapa anti foam merupakan *surface active agent* sehingga dapat mengurangi kecepatan transfer oksigen hingga 50% (Stanbury and Whitaker, 1984).

2.2.7 Agitasi

Kultur *Rhizopus* memiliki morfologi yang kompleks. Miselia jamur ini dapat tumbuh membentuk miselia *mates* (kusut) , miselia *clumps* (rumpun) atau pellet-pellet miselia tergantung kondisi operasi proses dan strain jamur. Ukuran miselia pellet bervariasi antara 1 – 10 mm. Pertumbuhan filamen akan membentuk suspensi yang homogen yang dapat terdispersi dalam cairan medium menghasilkan kaldu fermentasi yang sangat viskos, Kondisi tersebut akan mempengaruhi proses perpindahan massa dan transfer oksigen terutama untuk produksi asam laktat skala besar dalam tangki berpengaduk. *Rhizopus oryzae* dalam media cair akan tumbuh dari miselia menjadi pellet-pellet kecil hingga membentuk gumpalan-gumpalan yang cukup besar. Bentuk fisik dari pertumbuhan jamur ini dipengaruhi oleh strain jamur, pengadukan , aerasi, konsentrasi inokulum, dan pH media fermentasi (J.M Dominguez *et al.*, 1999).

Rheology kaldu fermentasi dipengaruhi oleh perubahan komposisi media selama proses fermentasi, pertumbuhan kultur, konsentrasi dan morfologi biomassa serta konsentrasi produk. Media fermentasi yang mengandung tepung sebagai sumber karbon merupakan media non-Newtonian dan relatif viskos. Tetapi mikroba yang tumbuh akan menguraikan tepung dan mengubah rheology media dan mengurangi viskositas, namun akan diiringi dengan pertumbuhan biomassa sehingga akan meningkatkan kembali viskositas media. Pengaruh pertumbuhan biomassa bermiselial terhadap rheology media fermentasi lebih besar dibandingkan dengan pemakaian media yang viskos.

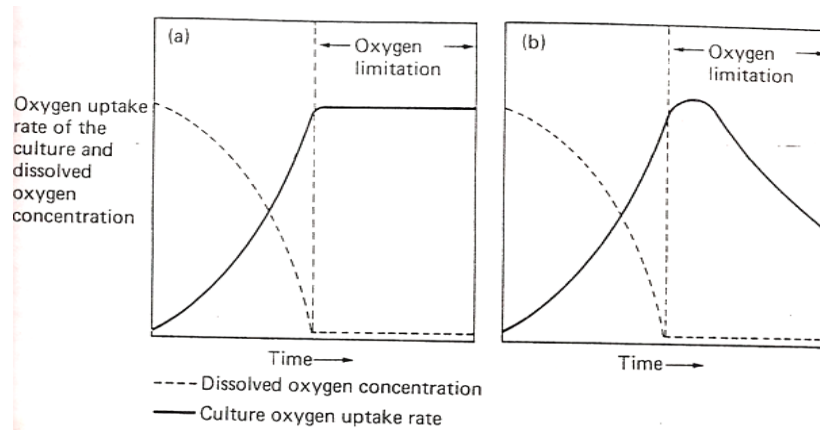
Selain itu kebutuhan oksigen di awal proses (pada saat media masih cukup viskos) lebih kecil karena jumlah mikroba masih sedikit dibandingkan pada akhir proses (Stanbury and Whitaker, 1984).

Pertumbuhan biomassa dan bentuk morfologi mikroba mempengaruhi transfer oksigen. Fermentasi bakteri dan yeast cenderung menghasilkan kaldu fermentasi Newtonian dan tidak viskos (kondisi aliran turbulen tercapai) sehingga tidak menghambat proses transfer oksigen. Masalah penghambatan transfer oksigen banyak terjadi pada kaldu fermentasi non-Newtonian dari jamur dan golongan *streptomyces*, sehingga produktivitas dibatasi oleh ketersediaan oksigen. Perbedaan pola penyerapan oksigen antara fermentasi dengan mikroba uniselular dan bermiselial diilustrasikan pada Gambar 2.5. Pada fasa eksponensial kedua mikroba itu menunjukkan pola penyerapan oksigen yang serupa hingga mencapai batas ketersediaan oksigen. Pada batas ketersediaan oksigen, saat pertumbuhan mencapai fasa aritmetik, penyerapan oksigen berlangsung konstan untuk mikroba uniseluler, tapi mengalami penurunan untuk mikroba bermiselial. Penurunan penyerapan oksigen tersebut karena peningkatan viskositas kultur akibat peningkatan konsentrasi miselia (Stanbury and Whitaker, 1984).

Pada penggunaan inokulum dengan konsentrasi spora yang tinggi (1×10^6 spora/ml) pengaruh aerasi sangat jelas terlihat. Tingkat aerasi yang tinggi, dengan perbandingan volume media fermentasi cair terhadap volume erlemeyer 100/500 dan 150/500) akan menghasilkan konsentrasi spora yang tinggi dan produksi asam laktat yang rendah. Sebaliknya tingkat aerasi yang rendah, dengan perbandingan media fermentasi cair terhadap volume erlemeyer 200/500 dan 250/500) akan menghasilkan meningkatkan produksi asam laktat dan menurunkan konsentrasi spora. Sehingga dapat disimpulkan bahwa laju aerasi yang rendah akan meningkatkan produksi asam laktat, tapi

tingkat aerasi yang tinggi akan memacu pembentukan spora (J.M Dominguez *et al.*, 1999).

Pengaruh negatif lain yang terlihat pada penggunaan tingkat aerasi yang tinggi adalah miselia tumbuh memanjang hingga mencapai 10 mm sehingga akan membatasi proses perpindahan massa. Penggunaan aerasi yang rendah akan menghasilkan spora yang tumbuh menjadi pellet-pellet kecil dengan ukuran yang seragam sehingga menguntungkan untuk proses perpindahan massa. Kondisi optimum perbandingan volume media fermentasi cair dan volume erlemeyer adalah 200/500 (J.M Dominguez *et al.*, 1999).



Gambar 2.5 Pengaruh keterbatasan oksigen terhadap laju penyerapan oksigen dalam kultur. (a) fermentasi bakterial (b) fermentasi jamur (Stanbury and Whitaker, 1984)

2.3 Kinetika Proses Fermentasi

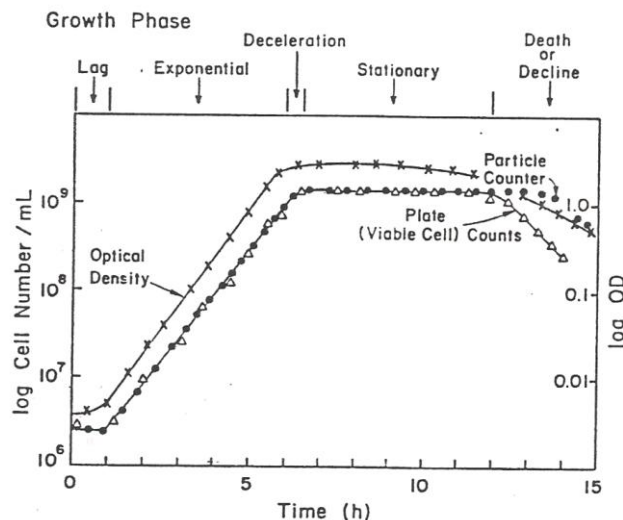
Model kinetika berperan penting untuk memantau dan memprediksi proses fermentasi. Model kinetika terdiri dari kinetika pertumbuhan, penggunaan substrat dan pembentukan produk. Model kinetika pertumbuhan dibagi menjadi dua tipe yaitu *unstructured* dan *structured*. Model *unstructured* lebih sederhana karena biomassa sel dipandang sebagai bentuk yang seragam (*single component*) tanpa dinamika internal sel sehingga laju reaksi hanya

tergantung pada kondisi fasa liquid dalam reaktor. Sedangkan Model *structured* memasukkan faktor internal sel seperti perubahan komposisi biomassa, sehingga model ini lebih kompleks (Bailey and Ollis, 1987).

Hampir seluruh model matematika proses fermentasi asam laktat adalah *unstructured*. Biomassa dipandang sebagai satu kesatuan, dituangkan dalam bentuk konsentrasi biomassa, memiliki hubungan linier dengan pembentukan produk dan biomassa. Model ini memiliki sedikit parameter, sehingga mudah diestimasi untuk percobaan pada keadaan steady state dan *open ended*, dan lebih mudah dikembangkan untuk sistem yang lebih kompleks (Busairi, 2002).

2.3.1 Kinetika pertumbuhan

Pertumbuhan mikroba dalam reaktor batch akan melalui tahap-tahap berikut : (1) fase lag, (2) fase logaritmik/eksponensial, (3) fase perlambatan pertumbuhan, (4) fase stasioner dan (5) fase kematian. Gambar 2.6 menjelaskan fase-fase tersebut.



Gambar 2.6 Kurva pertumbuhan mikroba pada kultur batch (Shuler and Kargi, 1992)

Fase lag segera terjadi setelah inokulasi, disebut juga sebagai masa adaptasi terhadap lingkungan baru. Mikroorganisma mereorganisasi komponen molekularnya pada saat menyerap nutrisi baru. Komposisi dan jenis nutrisi akan mempengaruhi jenis enzim yang disintesa, enzim yang dibutuhkan akan dibentuk, enzim yang tidak diperlukan akan ditekan. “Mesin” proses di dalam sel menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan baru. Perubahan ini akan terefleksikan dalam mekanisme sel melalui pengaturan proses metabolisme. Selama fase ini massa sel bertambah sedikit tanpa merubah densitas sel. Konsentrasi yang rendah beberapa nutrisi dan faktor pertumbuhan akan menghasilkan fase lag yang panjang. Periode fase lag sangat bergantung pada umur dari inokulum. Inokulum yang optimum akan menghasilkan fase lag yang minimum. Untuk mempersingkat fase lag, sel harus ditumbuhkan pada media dan kondisi pertumbuhan yang optimum, sel harus aktif, dan volume inokulum berkisar antara 5% sampai 10% (Shuler and Kargi, 1992).

Pada fase eksponensial, sel telah beradaptasi dengan lingkungannya yang baru. Sel akan tumbuh dengan cepat, sehingga massa sel dan jumlah sel akan bertambah secara eksponensial terhadap waktu, terjadi *balance growth* yaitu semua komponen dalam sel tumbuh dengan kecepatan yang sama. Komposisi sebuah sel mendekati konstan. Pada *balance growth*, laju pertumbuhan spesifik akan sama baik ditentukan secara massa sel ataupun jumlah sel. Konsentrasi nutrisi pada fase ini besar, maka laju pertumbuhan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi nutrisi. Laju pertumbuhan pada fase eksponensial mengikuti persamaan diferensial orde pertama (Shuler and Kargi, 1992).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

$X = X_0$ pada $t = 0$

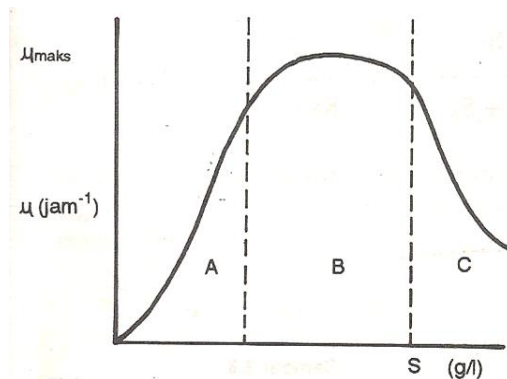
X adalah konsentrasi biomassa (g/l), t adalah waktu (jam) dan μ adalah laju pertumbuhan spesifik (jam^{-1}).

Integrasi persamaan di atas menghasilkan

$$\ln X = \mu t + \ln X_0$$

(2.2)

Pada fermentasi batch, laju pertumbuhan spesifik adalah konstan dan dipengaruhi oleh perubahan konsentrasi nutrien. Pada konsentrasi nutrien awal yang rendah akan menghasilkan laju pertumbuhan yang lebih kecil dari laju pertumbuhan spesifiknya. Hubungan laju pertumbuhan dengan konsentrasi substrat (S) ditunjukkan oleh Gambar 2.7. Pada daerah A terdapat pembatasan oleh substrat. Pada kondisi ini peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju pertumbuhan mikroba. Pada daerah B tak terdapat pembatasan, dijumpai pada fasa eksponensial. Pada daerah C terjadi penghambatan oleh substrat. Pada saat S mendekati 0, μ berbanding lurus dengan S , sedangkan jika S berlebihan μ tidak bergantung pada S , $\mu = \mu_m$ (laju pertumbuhan spesifik maksimum) (Mangunwidjaja, 1994).



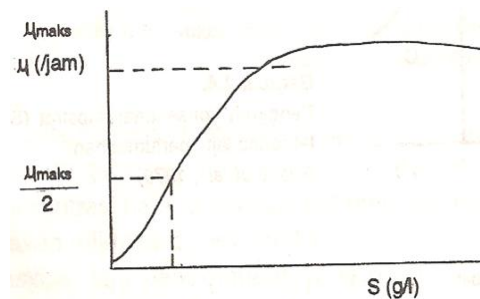
Gambar 2.7 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju pertumbuhan spesifik (Mangunwidjaja, 1994)

Model *unstructured* yang sering digunakan untuk menggambarkan kinetika pertumbuhan adalah persamaan Monod. Model ini mengekspresikan bahwa laju pertumbuhan spesifik mikroba akan meningkat jika konsentrasi substrat meningkat. Namun laju pertumbuhan spesifik akan turun pada konsentrasi substrat yang terlalu tinggi. Persamaan Monod menggambarkan laju pertumbuhan spesifik merupakan fungsi dari konsentrasi substrat pembatas (S):

$$\mu = \mu_m \left[\frac{S}{K_s + S} \right] \quad (2.3)$$

Model Monod ditunjukkan oleh Gambar 2.8. K_s adalah tetapan kejenuhan, yaitu konsentrasi substrat pada $\mu = \frac{1}{2} \mu_m$. Nilai K_s bergantung pada jenis mikroba dan jenis substrat yang digunakan. Untuk substrat gula, nilai K_s berkisar 1-100 mg/l. Sedangkan untuk substrat nitrogen nilai K_s lebih rendah dari substrat gula. Secara umum, bila $S > 3K_s$, maka $\mu = \mu_m$ (Mangunwidjaja, 1994). Modifikasi persamaan (2.3) menghasilkan bentuk berikut :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (2.4)$$



Gambar 2.8 Model Monod pertumbuhan mikroba (Mangunwidjaja, 1994)

Persamaan kinetika pertumbuhan mikroba yang menggabungkan persamaan (2.1) dan (2.3). Persamaan tersebut memiliki bentuk sebagai berikut :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} X \quad (2.5)$$

Persamaan serupa diusulkan dengan memasukkan komponen laju kematian mikroba spesifik, mengikuti bentuk berikut (Busairi, 2002) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} X - k_d X \quad (2.6)$$

Kinetika pertumbuhan mikroba pada fermentasi asam laktat oleh *L.amylophilus* yang menggunakan model logistik mengekspresikan hubungan antara kecepatan pertumbuhan dengan dua parameter kinetik seperti kecepatan pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m) dan konsentrasi biomassa maksimum (X_m). Kedua parameter tersebut dapat diestimasi melalui regresi non-linier dengan metoda least square (Busairi, 2002). Bentuk persamaan model tersebut adalah :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (2.7)$$

Integrasi persamaan di atas menghasilkan persamaan berikut :

$$X_t = \frac{X_o X_m \exp(\mu_{\max} t)}{X_m - X_o + X_o \exp(\mu_{\max} t)} \quad (2.8)$$

Model logistik kinetika pertumbuhan untuk fermentasi asam laktat dari bahan baku kayu, ditemukan sangat sesuai dengan data percobaan. Parameter kinetika X_m dan μ_m yang diperoleh yaitu 2,95 g/l dan 0,737 jam⁻¹ atau 2,06 g/l

dan $0,29 \text{ jam}^{-1}$, dengan substrat dan strain yang digunakan berbeda (Busairi, 2002).

Fase perlambatan pertumbuhan terjadi setelah fase eksponensial. Pada fase ini perlambatan pertumbuhan terjadi karena berkurangnya konsentrasi satu atau lebih nutrisi esensial dan terakumulasinya produk yang bersifat toksik terhadap pertumbuhan. Perubahan lingkungan yang cepat menyebabkan terjadinya *imbalance growth*. Pada fase eksponensial sistem pengendali proses metabolisme seluler ditunjukkan menghasilkan laju reproduksi yang maksimum, namun pada fase perlambatan pertumbuhan tekanan yang diakibatkan oleh terbatasnya nutrisi dan lingkungan yang toksik akan merubah sistem pengendali proses metabolisme seluler agar bisa tetap bertahan pada kondisi yang tidak menguntungkan (Shuler and Kargi, 1992).

Setelah fase perlambatan pertumbuhan selesai dimulailah fase stasioner. Pada fase ini laju pertumbuhan adalah nol (tidak ada pembelahan sel) atau laju pertumbuhan sama dengan laju kematian. Konsentrasi massa tetap, namun jumlah sel yang hidup akan berkurang, terjadi lisis sel dan sebagian sel dapat tumbuh pada produk hasil lisis sel tersebut. Walaupun laju pertumbuhan adalah nol selama fase stasioner tetapi metabolisme sel masih aktif dan menghasilkan metabolit sekunder, sebagai hasil dari perubahan pengendalian seluler karena terbatasnya konsentrasi nutrisi esensial. Produksi metabolit sekunder (antibiotik, hormon) justru meningkat pada fase stasioner. Selama fase stasioner, sel mengkatabolisme nutrisi yang tersimpan dalam sel (*endogenous metabolism*) sehingga diperoleh energi (*maintenance energy*) untuk pemeliharaan membran sel, transportasi nutrisi, gerak dan perbaikan struktur sel yang rusak. Pertumbuhan mikroba akan terhenti selain disebabkan oleh terbatasnya konsentrasi nutrisi esensial dan terakumulasinya produk yang bersifat toksik juga disebabkan oleh terbentuknya produk yang menghambat

pertumbuhan. Penghambatan ini tergantung pada jenis dan konsentrasi produk penghambatnya. Produksi etanol oleh ragi merupakan contoh produk penghambat pertumbuhan. Hal tersebut dapat dicegah dengan cara mengencerkan medium yang tercemar toksik, menambahkan komponen kimia yang membentuk kompleks dengan produk penghambat dan tidak termetabolisme, dan memindahkan secara berkesinambungan produk penghambat dari dalam reaktor (Shuler and Kargi, 1992).

Fasa kematian kemudian akan terjadi setelah fasa stasioner. Namun kematian sel sebenarnya telah terjadi selama fase stasioner sehingga batas yang jelas untuk kedua fase tersebut tidak ada (Shuler and Kargi, 1992).

Parameter kinetika lain dapat dirumuskan untuk menjelaskan lebih lanjut tentang kinetika pertumbuhan mikroba yaitu koefisien perolehan/yield. Koefisien yield pertumbuhan dirumuskan sebagai jumlah sel kering yang dihasilkan per jumlah substrat yang dikonsumsi ($Y_{X/S}$).

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S \quad (2.9)$$

2.3.2 Kinetika penggunaan substrat

Kinetika penggunaan substrat fermentasi asam laktat oleh *L.delbrueckii* telah dikembangkan dengan mempertimbangkan bahwa substrat yang dikonsumsi dikonversi menjadi biomass dan pembentukan asam laktat juga digunakan untuk pemeliharaan (Busairi, 2002). Persamaannya mengikuti bentuk berikut :

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} + mX \quad (2.10)$$

Parameter yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$), yield produk terhadap substrat ($Y_{P/S}$) dan koefisien pemeliharaan (m) diestimasi dengan

analisa nonlinier. $Y_{P/S}$ juga dapat didefinisikan sebagai jumlah produk yang dihasilkan perjumlah substrat yang dikonsumsi.

$$Y_{P/S} = \Delta P / \Delta S \quad (2.11)$$

Persamaan yang lebih sederhana diusulkan dengan mengasumsikan bahwa koefisien untuk pemeliharaan sangat kecil dibandingkan dengan laju pertumbuhan spesifik, sehingga bisa diabaikan. Substrat digunakan untuk pembentukan biomassa dan produk saja. Persamaan itu mengikuti bentuk berikut :

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \quad (2.12)$$

Persamaan kinetika penggunaan substrat yang paling sederhana diusulkan dengan mengasumsikan bahwa substrat yang dikonsumsi hanya digunakan untuk pembentukan biomassa saja. Persamaan tersebut mengikuti bentuk:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) X \quad (2.13)$$

Parameter kinetika $Y_{x/s}$ dan K_s dapat diestimasi dengan analisa regresi linier.

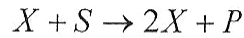
Kinetika penggunaan substrat pada fermentasi asam laktat dituangkan pula dalam bentuk persamaan berikut :

$$-\frac{dS}{dt} = k_3 S \quad (2.14)$$

Konstanta kecepatan reaksi persamaan orde satu k_3 dapat diestimasi dengan analisa regresi linier.

Kinetika penggunaan substrat untuk fermentasi asam laktat oleh *L. delbrueckii*, proses fermentasi dapat dipandang sebagai reaksi biologis irreversible yang mengikuti reaksi berikut :

$$(2.15)$$



Model kinetika penggunaan substrat digambarkan melalui persamaan berikut :

$$-\frac{dS}{dt} = k_s SX \quad (2.16)$$

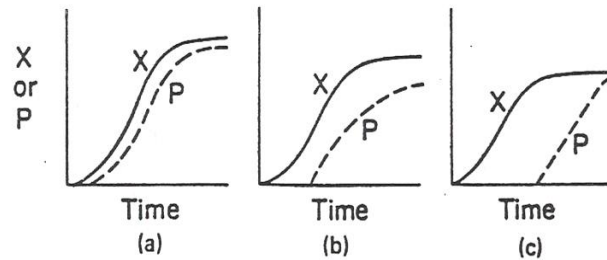
Dimana k_s adalah konstanta penggunaan substrat.

2.3.3 Kinetika pembentukan produk

Pembentukan produk mikrobial dapat digolongkan dalam 3 pola yaitu :

- Pola pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan. Laju pembentukan spesifik produk berbanding lurus dengan laju spesifik pertumbuhan. Enzim merupakan contoh produk yang dihasilkan dari pola pertumbuhan di atas.
- Pola pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan. Pembentukan produk terjadi pada fasa stasioner pada saat laju pertumbuhan adalah nol. Laju spesifik pembentukan produk adalah konstan. Antibiotik merupakan metabolit sekunder yang terbentuk melalui pola pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan.
- Pola campuran, produk terbentuk selama pertumbuhan yang lambat dan fase stasioner. Laju spesifik pembentukan produk mengikuti persamaan *Luedeking-Piret*. Asam laktat, xanthan gum merupakan contoh metabolit sekunder yang diproduksi melalui pola campuran (Mangunwidjaja, 1994).

Tiga jenis pola pembentukan produk tersebut ditunjukkan oleh Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Tipe pola pertumbuhan dan pembentukan produk pada fermentasi batch. (a) Pola pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan. (b) Pola campuran dan (c) Pola pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan (Shuler and Kargi, 1992)

Fermentasi asam laktat. pertumbuhan dan pembentukan produk memiliki hubungan sebagian (mengikuti pola campuran). Model sederhana yang menggambarkan hubungan antara produksi asam laktat terhadap laju pertumbuhan dan konsentrasi biomassa adalah sebagai berikut :

$$\frac{dp}{dt} = k_1 \frac{dX}{dt} + k_2 X \quad (2.17)$$

dp/dt adalah pembentukan produk volumetrik (g/l.jam), k_1 adalah koefisien pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan (g produk/g sel) dan k_2 adalah koefisien pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan (g produk/g sel.jam) (Busairi, 2002).

2.4 Optimasi Variabel Proses

2.4.1 Rancangan percobaan

Metodologi penelitian secara empiris dapat digolongkan dalam 2 group besar yaitu :

- klasik atau pasif
- aktif atau perancangan secara statistika

Rancangan percobaan klasik adalah rancangan percobaan yang meneliti satu variabel bebas saat itu dimana semua variabel bebas (faktor) lain dijaga konstan. Dengan kata lain rancangan percobaan klasik bertujuan mempelajari hubungan timbal balik antara variabel-variabel terhadap suatu sistem dibawah *specially adapted condition*.

Jika suatu sistem penelitian melibatkan k faktor pada p buah level, maka rancangan percobaan klasik membutuhkan untuk setiap faktor diteliti pada setiap level sementara faktor yang lain dijaga konstan. Jumlah run total percobaan adalah :

$$N = k(p-1) + 1 \quad (2.18)$$

Sebagai contoh, suatu sistem penelitian yang menghasilkan yield y dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu X_1 , X_2 dan X_3 . Jika semua faktor berubah pada 2 level ($p=2$) maka jumlah percobaan yang harus dilakukan adalah empat ($N=4$), dengan rancangan percobaan disajikan pada Tabel 2.3. Dari data percobaan dapat ditentukan pengaruh faktor terhadap yield produk sebagai berikut :

$E_{X1} = y_2 - y_1$; pengaruh X_1 terhadap yield

$E_{X2} = y_3 - y_1$; pengaruh X_2 terhadap yield

$E_{X3} = y_4 - y_1$; pengaruh X_3 terhadap yield

Tabel 2.3 Rancangan percobaan untuk k = 3, p = 2.

Run	Kombinasi faktor-level			Respon y	Catatan
	X_1	X_2	X_3		
1	-	-	-	y_1	run referensi
2	+	-	-	y_2	
3	-	+	-	y_3	
4	-	-	+	y_4	

Kelemahan dari hasil yang diperoleh adalah tidak diketahui *error* dari setiap percobaan, tidak diketahui pengaruh interaksi antar variabel, dan y_1 sebagai percobaan referensi terlalu banyak digunakan untuk menentukan pengaruh dari semua variabel. Alasan tersebut yang menyebabkan para peneliti memutuskan mengulang percobaan untuk memastikan keakuratan hasil yang diperoleh.

Rancangan percobaan klasik kemudian diperbaiki dengan memakai rancangan statistik, selain itu data percobaan dianalisa secara statistic pula. Rancangan percobaan dikembangkan dengan penambahan kombinasi percobaan faktor dan level, disebut sebagai *full factorial design*. Rancangan percobaan *full factorial design* 2^k disajikan pada Tabel 2.4. Dari delapan run percobaan, satu run digunakan sebagai percobaan referensi, tiga run untuk menentukan pengaruh dari masing masing variabel (E_{X_1} , E_{X_2} , E_{X_3}) dan empat run untuk menentukan pengaruh dari interaksi antar variabel ($E_{X_1E_{X_2}}$, $E_{X_1E_{X_3}}$, $E_{X_2E_{X_3}}$ dan $E_{X_1E_{X_2}E_{X_3}}$) (Lazic, 2004).

Tabel 2.4 Rancangan percobaan 2^k full factorial untuk $k = 3$, $p = 2$.

Run	Kombinasi faktor-level			Respons	Catatan
	X_1	X_2	X_3	y	
1	-	-	-	y_1	run referensi
2	+	-	-	y_2	
3	-	+	-	y_3	
4	+	+	-	y_4	
5	-	-	+	y_5	
6	+	-	+	y_6	
7	-	+	+	y_7	

8	+	+	+	y_8
---	---	---	---	-------

2.4.2 Response Surface Methods (RSM)

Response Surface Methods (RSM) merupakan metoda yang menggabungkan teknik matematika dan statistik, menghasilkan suatu peta *contour* efek linier, interaksi dan kuadratik dari dua atau lebih variabel bebas terhadap suatu variabel tidak bebas (respon). Efek-efek tersebut dinyatakan dalam model matematis *full quadratic polynomial*. Sebagai contoh untuk penelitian yang melibatkan tiga variabel bebas diperoleh persamaan sebagai berikut :

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2.$$

Y adalah variabel tidak bebas, b_0 adalah koefisien regresi pada center point, b_1 , b_2 , b_3 adalah koefisien linier, x_1 , x_2 dan x_3 adalah variabel bebas, b_{12} , b_{13} , b_{23} koefisien interaksi dan b_{11} , b_{22} dan b_{33} adalah koefisien kuadratik. Koefisien persamaan kuadratik polynomial dihitung menggunakan analisa regresi.

Setiap efek variabel bebas dalam persamaan tersebut dapat diestimasi untuk mendapatkan respon yang optimal. Untuk mendapatkan informasi yang mencukupi, maka rancangan percobaan harus memiliki paling sedikit tiga buah level atau lebih untuk masing-masing variabel bebas. Karena itu ditambahkan beberapa run percobaan sebagai *center points* (*Central composite design*). *Center points* berperan sebagai barometer dari *variability* dalam sistem percobaan.

McDaniel *et al.* (1976) berhasil menggunakan *Response Surface Methods* (RSM) untuk mengoptimasi media produksi *candidin* oleh *Streptomyces vindoflavus*. Box dan Wilson (1951) telah mengembangkan dan

memodifikasi rancangan percobaan dengan tiga buah level untuk mengurangi jumlah run percobaan sehingga waktu untuk optimasi medium fermentasi dapat dipersingkat (Greasham, 1993).

BAB III

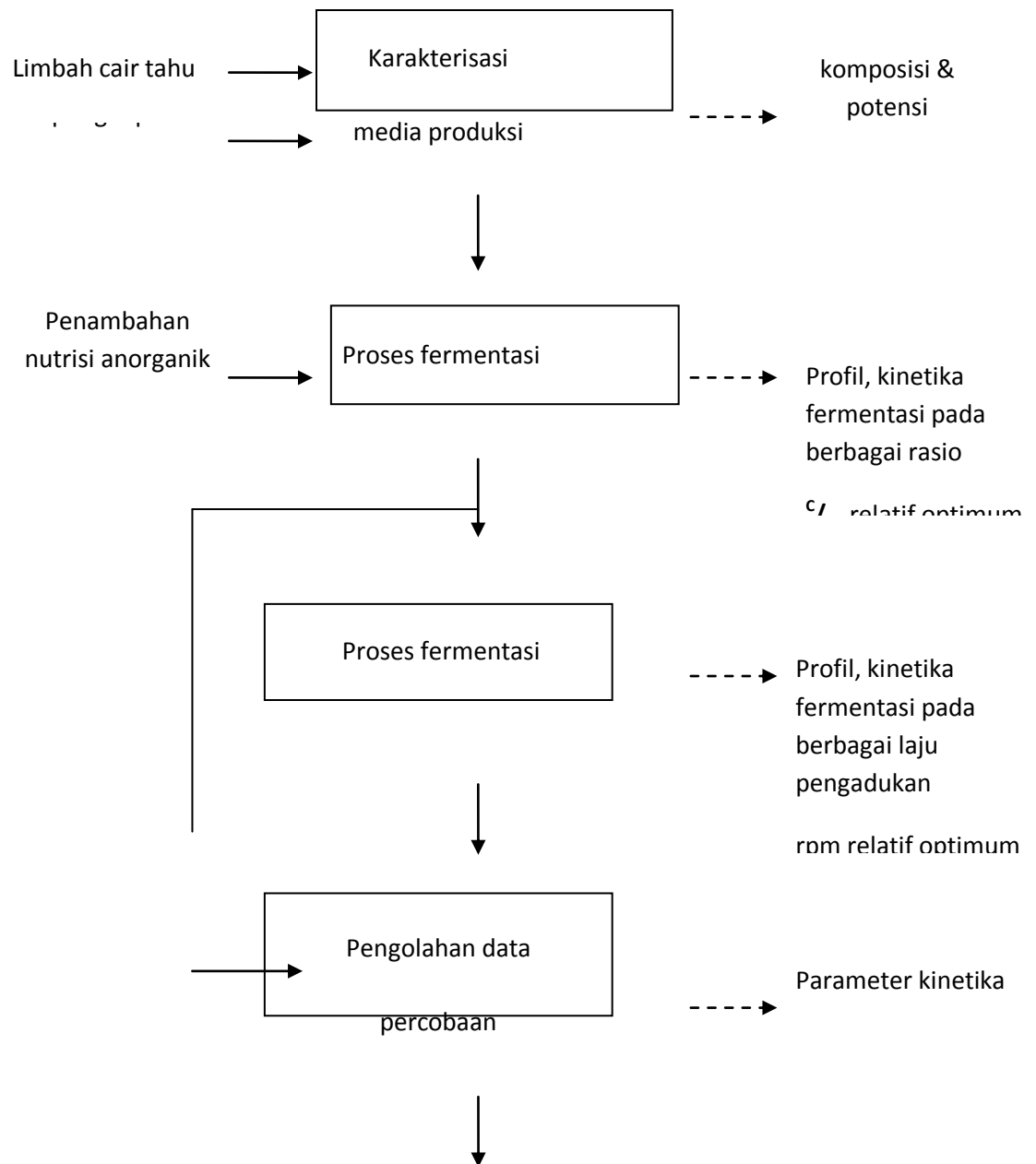
METODOLOGI PENELITIAN

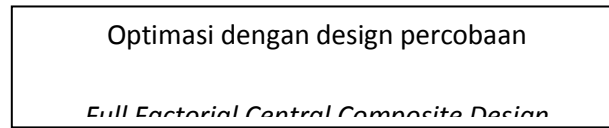
3.1. Kerangka Percobaan

Penelitian ini dilakukan melalui metoda eksperimental yang meliputi beberapa tahap berkesinambungan agar tujuan dari penelitian ini dapat tercapai. Diagram alir kerangka percobaan disajikan pada Gambar 3.1.

- Tahap I adalah karakterisasi media fermentasi yaitu tepung tapioka dan limbah cair tahu sehingga diperoleh informasi yang cukup tentang komposisi dan potensinya. Karakterisasi meliputi pengujian gula total (gula tereduksi), nitrogen, fosfat, sulfat dan pH.
- Tahap II adalah pengujian proses fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* dalam media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu. Variabel yang divariasikan adalah jumlah tepung tapioka yang ditambahkan pada volume limbah cair tahu yang tetap. Data-data yang diambil selama proses fermentasi adalah konsentrasi biomassa, konsentrasi substrat (gula total/tereduksi), dan konsentrasi produk (asam laktat). Pada tahap ini akan diperoleh profil kinetika fermentasi pada berbagai rasio C/N, sehingga dapat ditentukan rasio C/N relatif optimum.
- Tahap III adalah pengujian proses fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* dalam media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu. Variabel yang divariasikan adalah laju pengadukan pada rasio C/N optimum yang diperoleh dari tahap II. Data-data yang diambil selama proses fermentasi adalah konsentrasi biomassa, konsentrasi substrat (gula total/tereduksi) dan konsentrasi produk (asam laktat). Pada tahap ini akan diperoleh profil kinetika

fermentasi pada berbagai laju pengadukan, sehingga dapat ditentukan laju pengadukan relatif optimum.





Pengaruh dan kondisi optimum
konsentrasi amilum dan laju pengadukan
terhadap pertumbuhan biomassa
dan pembentukan asam laktat

Gambar 3.1 Diagram alir kerangka percobaan

- Tahap IV adalah pengolahan data berdasarkan hubungan matematis antara konsentrasi biomassa, dan konsentrasi substrat (gula total) terhadap waktu selama proses fermentasi untuk memperoleh parameter kinetika. Parameter kinetika yang ditentukan adalah laju pertumbuhan spesifik (μ), laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m), konstanta saturasi (K_s), yield biomassa terhadap substrat ($Y_{x/s}$), yield produk terhadap biomassa ($Y_{p/s}$) dan konstanta penggunaan substrat (k_3). Parameter kinetika tersebut akan menggambarkan *performance* (unjuk kerja) dari proses fermentasi.
- Tahap V adalah tahap optimasi berdasarkan design percobaan *Full Factorial Central Composite Design* dengan variabel bebas yaitu konsentrasi amilum

dan laju pengadukan terhadap variabel tidak bebas yaitu konsentrasi biomassa dan konsentrasi asam laktat. Pada tahap ini dapat dipelajari pengaruh dan kondisi optimum konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap pertumbuhan biomassa dan pembentukan asam laktat.

3.2 Karakterisasi Media Produksi

Tepung tapioka diperoleh di pasaran, memiliki kadar air $\pm 12\%$. Limbah cair tahu diperoleh dari pabrik sekitar desa Ciwaruga dianalisa komposisinya antara lain total gula tereduksi, total Kjeldahl-N, fosfat, sulfat dan pH. Limbah cair tahu memiliki pH rendah (± 4) karena mengandung sejumlah kecil asam-asam organik dan akan menghambat produksi asam laktat. Untuk mencegah penghambatan oleh pH rendah ditambahkan CaCO_3 sehingga mencapai pH 6.

3.3 Proses Fermentasi

3.3.1 Mikroorganisma

Kultur murni *Rhizopus oryzae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung. Strain *Rhizopus oryzae* tersebut ditumbuhkan dalam media agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai *stock culture* dan disimpan pada suhu 4°C (Jin Bo et al., 2005).

3.3.2 Media fermentasi

Media sintesis yang digunakan sebagai media pra-kultur untuk pembuatan inokulum fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* memiliki komposisi yaitu

amilum terlarut (*starch soluble*) 10 g/l; peptone 5 g/l; yeast ekstrak 5 g/l; KH_2PO_4 0,2 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l. Dilakukan juga penambahan CaCO_3 1% di awal untuk mengendalikan pH pada nilai 6. Media sintesis disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit (Jin Bo et al., 2005).

Media produksi terdiri dari campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu dengan perbandingan tertentu untuk menghasilkan rasio C/N yang berbeda. Limbah cair tahu disaring untuk memisahkan padatannya. Tepung tapioka dan limbah cair tahu kemudian dicampurkan dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit.

3.3.3 Rancangan percobaan proses fermentasi

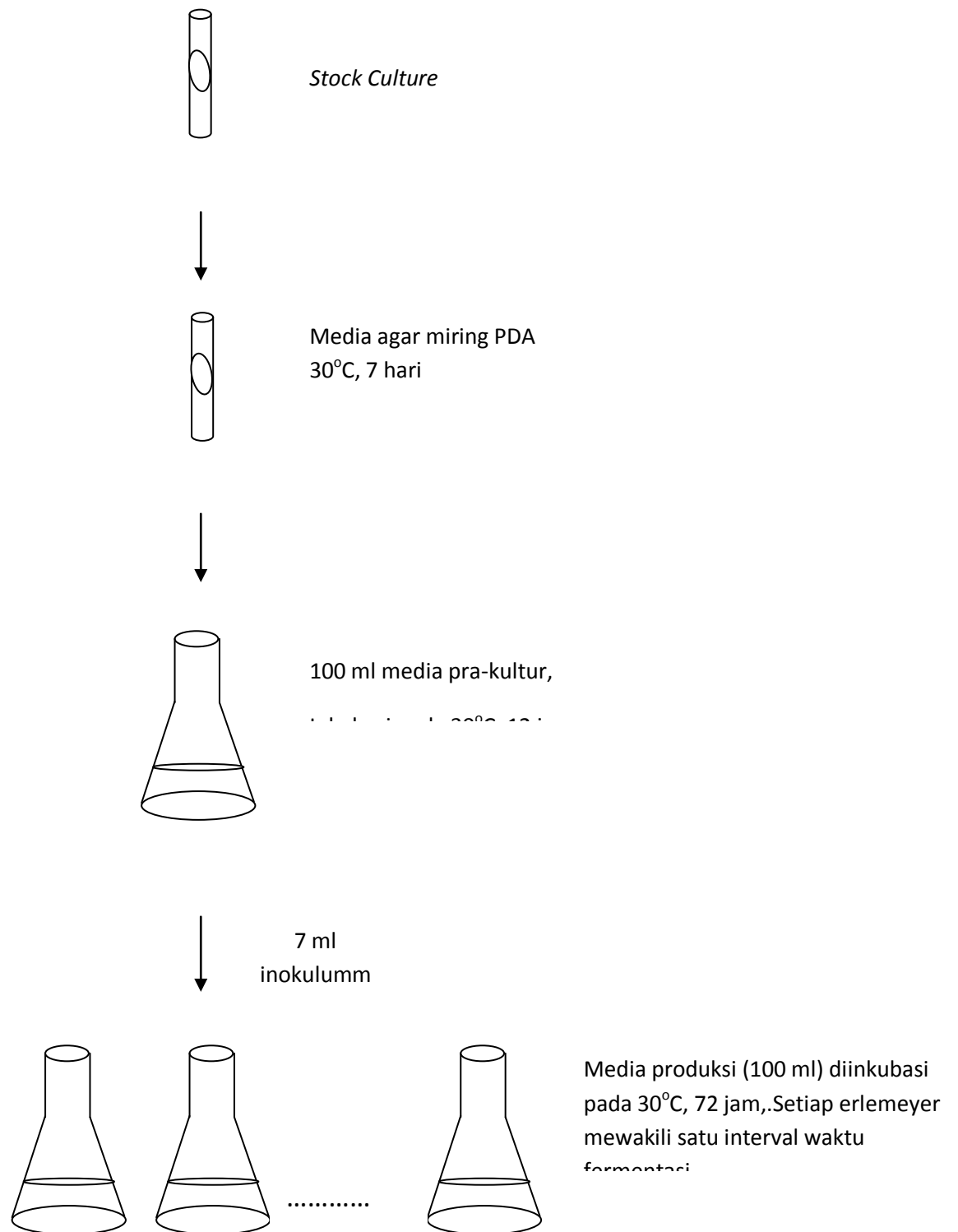
Skema rancangan percobaan proses fermentasi dan matriks rancangan percobaan tahap II dan III disajikan pada Gambar 3.2, Tabel 3.1.

Spora *Rhizopus oryzae* digesek pada media agar miring PDA kemudian ditumbuhkan pada suhu 30°C selama 7 hari. Spora *Rhizopus oryzae* yang terbentuk dilepaskan dari permukaan agar miring dengan menggunakan jarum ose dan suspensikan ke dalam larutan air demineralisasi steril.

Spora *Rhizopus oryzae* diinokulasikan dalam 100 ml media pra kultur pada erlemeyer bervolume 250 ml. Kemudian diinkubasi pada *Incubator shaker* (150 rpm) pada suhu 30°C selama 12 jam. Kultur yang telah diinkubasi disebut sebagai inokulum atau *seed culture* dan digunakan sebagai bibit untuk media produksi. Tahap II dilakukan proses fermentasi secara batch dalam erlemeyer 250 ml dengan volume media produksi 100 ml. Variasi komposisi media produksi adalah 20,30,40 dan 50 gram tepung tapioka untuk setiap liter limbah cair tahu untuk menghasilkan rasio C/N 1,6; 2,4; 3,2 dan 4. Setiap run berisi 10 buah erlemeyer. Setiap erlemeyer mewakili satu interval waktu fermentasi. Waktu fermentasi berlangsung selama 72 jam dengan

interval pengambilan data setiap 8 jam. Media produksi kemudian diinokulasi dengan 7 ml inokulum, dan ditempatkan dalam *Incubator shaker* dengan laju pengadukan 150 rpm, suhu 30°C.

Tahap III dilakukan setelah rasio C/N relatif optimum diperoleh pada tahap II. Proses fermentasi secara *batch* dalam erlemeyer 250 ml dengan volume media produksi 100 ml. Komposisi media produksi adalah pada rasio C/N relatif optimum. Laju pengadukan 100, 150, 200 dan 250. Setiap run berisi 10 buah erlemeyer. Setiap erlemeyer mewakili satu interval waktu fermentasi. Waktu fermentasi berlangsung selama 72 jam dengan interval pengambilan data setiap 8 jam. Media produksi kemudian diinokulasi dengan 7 ml inokulum, dan ditempatkan dalam *Incubator shaker* pada suhu 30°C.



1

2

10

Gambar 3.2 Diagram alir fermentasi asam laktat dengan media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu oleh *Rhizopus oryzae*

Tabel 3.1 Matriks rancangan percobaan tahap II dan III

	VARIABEL		RESPON			
Run	Rasio C/N	Kecepatan pengadukan (rpm)	Konsentrasi biomassa (g/l)	Konsentrasi gula total (g/l)	Konsentrasi asam laktat (g/l)	Hasil
1	1,6	150				Profil, parameter kinetika dan C/N relatif opt
2	2,4	150				
3	3,2	150				
4	4	150				

5		100				Profil,
6	C/N	150				parameter
7	relatif	200				kinetika dan
8	Opt	250				rpm relatif
						opt

Kondisi operasi yang dipertahankan tetap adalah :

- Tekanan : 1 atm
- Umur dan volume inokulum : 12 jam, 7 ml
- pH : ± 6
- Suhu : 30°C
- Perbandingan volume media fermentasi terhadap volume reaktor : 1/2,5
- Waktu fermentasi : 72 jam
- Pengambilan sampel untuk pengukuran konsentrasi biomassa, gula total tereduksi dan asam laktat setiap 8 jam selama waktu fermentasi

Tahap V adalah adalah tahap optimasi variabel berdasarkan design percobaan *2² Full Factorial Central Composite Design*. Pada tahap ini dilakukan 13 run percobaan dengan variabel bebas konsentrasi amilum dan laju pengadukan. Proses fermentasi secara *batch* dalam erlemeyer 250 ml dengan volume media produksi 100 ml. Batasan/level dan matriks rancangan percobaan tahap V disajikan pada Tabel 3.2 dan Tabel 3.3.

Tabel 3.2 Batasan dan level variabel bebas untuk tahap IV

X , Variabel	Batasan dan level				
	- α - 1,414	- 1 30	0 40	+ 1 50	+ α + 1,414 54,14
X ₁ , rasio C/N	25,86	30	40	50	54,14
X ₂ , laju pengadukan rpm	79,3	100	150	200	220,7

Tabel 3.3 Matriks rancangan percobaan tahap IV

Run	Design matriks		Matriks kerja		Respon	
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	Konsentrasi biomassa (g/l)	Konsentrasi asam laktat (g/l)
1	+	+	50	200		
2	-	+	30	200		
3	+	-	50	100		
4	-	-	30	100		
5	-1,414	0	25,86	150		
6	+1,414	0	54,14	150		
7	0	-1,414	40	79,3		

8	0	+1,414	40	220,7		
9	0	0	40	150		
10	0	0	40	150		
11	0	0	40	150		
12	0	0	40	150		
13	0	0	40	150		

Kondisi yang dipertahankan tetap adalah :

- Tekanan : 1 atm
- Umur dan volume inokulum : 12 jam, 7 ml
- pH : ± 6
- Suhu : 30°C
- Perbandingan volume media fermentasi terhadap volume reaktor : 1/2,5
- Waktu fermentasi : 72 jam

3.3.4 Pengambilan dan perlakuan sampel

Selama proses fermentasi, 100 ml sampel diperoleh dari satu erlemeyer yang mewakili satu interval waktu fermentasi disentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit. Endapan yang diperoleh dicuci dua kali dengan 4 N HCl untuk menghilangkan sisa kalsium karbonat dan disaring dengan kertas saring Whatman 40 untuk pengukuran biomassa (Efremenko E et al., 2006). Biomassa yang diperoleh, kemudian dikeringkan dan ditimbang. Cairan hasil sentrifugasi digunakan untuk pengukuran

kadar gula total/tereduksi dan asam laktat. Sebagian cairan disentrifugasi pada 10000 rpm selama 10 menit menggunakan *minicentrifuge* Effendorf. Supernatan yang terbentuk dianalisa dengan HPLC (Jin Bo et al., 2005) untuk menentukan jenis isomer asam laktat yang dihasilkan dan dianalisa dengan *Conductometer* untuk menentukan konsentrasi asam laktat (Payot, 1997).

3.4 Metoda Analisa Sampel

Metoda analisa sampel untuk tahap karakterisasi dan tahap fermentasi adalah sebagai berikut :

- Kandungan nitrogen dalam limbah cair tahu dianalisa dengan metoda Kjeldahl-N(Jin Bo et al., 2005).
- Konsentrasi biomassa diukur dengan metoda berat sel kering. Pengeringan dilakukan pada suhu 60⁰C selama 36 jam (Jin Bo et al., 2005).
- Konsentrasi gula total diukur sebagai gula tereduksi (glukosa) setelah melalui proses hidrolisis dengan HCl. Glukosa dianalisa dengan metoda kolorimetrik dengan penambahan reagen DNS (*Dinitro salicylic acid*) menggunakan *Spectronic Genesis* pada $\lambda = 540$ dan dialurkan pada kurva standar glukosa (Jin Bo et al., 2003).
- Jenis isomer asam laktat dianalisa dengan menggunakan HPLC dengan kolom C18, UV *detector* (210 nm), *eluent* 0,2 M asam fosfat pada laju alir 0,8 ml/menit, suhu 25⁰C.
- Konsentrasi asam laktat diukur dengan *Conductometer* Methrom 660 dan dialurkan pada kurva standar asam laktat (Payot, 1997).

3.5 Peralatan dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Incubator shaker*, *autoclave*, *centrifuge*, *mini centrifuge*, *glassware*, jarum ose, oven, desikator, timbangan analitik, pH meter, *Spectronic Genesis*, HPLC dan *Conductometer*.

Bahan yang digunakan pada penelitian disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Daftar bahan penelitian

Bahan	Spesifikasi	Sumber
Kultur	murni	Lab. Mikrobiologi TK ITB
<i>Rhizopus oryzae</i>		
Potato Dextrose Agar (PDA)	Pro analisa (p.a)	Lab. Bioproses TK POLBAN

Tepung tapioka	-	Merk “Mawar”
Limbah cair tahu	-	Pabrik tahu Cimahi
<i>Starch soluble</i>	p.a	Merck
Peptone	p.a	Merck
Yeast ekstrak	p.a	Merck
KH_2PO_4	p.a	Merck
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	p.a	Merck
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.a	Merck
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.a	Merck
CaCO_3	p.a	Merck
Dinitro salicylic acid (DNS)	p.a	Merck
HCl	p.a	Merck
Kertas saring	40	Whatman

3.6 Pengolahan Data Percobaan

Data yang diambil selama proses fermentasi adalah konsentrasi volumetrik biomassa jamur (X g/l), konsentrasi gula total/tereduksi (S g/l), dan konsentrasi asam laktat (P g/l). Pengambilan data dilakukan dari t_0 sampai t_9 setiap 8 jam. Parameter kinetika yang ditentukan adalah laju pertumbuhan spesifik (μ , Pers. 2.2), Laju

pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m , Pers. 2.4), konstanta saturasi (K_s , Pers. 2.4), yield biomassa terhadap substrat ($Y_{x/s}$, Pers. 2.9), yield produk terhadap biomassa ($Y_{p/s}$, Pers. 2.11) dan konstanta penggunaan substrat (k_3 , Pers. 2.14).

Data hasil percobaan yang diperoleh pada tahap V kemudian dioptimasi dengan menggunakan software *Statistica 9* sehingga diperoleh model matematis *second order (quadratic) polynomial* untuk 2 faktor. Model matematis tersebut digunakan untuk memperkirakan hasil percobaan yang merupakan fungsi linier, interaksi dan kuadratik variabel bebas. Sejauh mana pengaruh variabel bebas terhadap hasil percobaan ditentukan lewat nilai koefisien yang diuji dengan nilai t dan nilai p. Ketepatan model matematis yang diperoleh terhadap data hasil percobaan dianalisa dengan *analysis of variance* (ANOVA).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain komposisi nutrisi, rasio C/N dan laju pengadukan. Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui komposisi nutrisi dari media fermentasi. Karakterisasi meliputi kadar nitrogen, gula total, fosfat dan sulfat. Dari hasil karakterisasi dapat ditentukan nutrisi apa saja yang harus ditambahkan pada media fermentasi untuk mendapatkan hasil yang optimal. Rasio C/N merupakan perbandingan jumlah unsur C terhadap unsur N dalam media fermentasi. Nilai Rasio C/N dalam media fermentasi akan mempengaruhi hasil fermentasi. Pengadukan bertujuan untuk menjamin ketersediaan oksigen dalam media fermentasi, sehingga laju pengadukan akan mempengaruhi hasil fermentasi. Pada Bab VI ini akan dijelaskan tentang karakterisasi media produksi, pengaruh rasio C/N dan laju pengadukan terhadap pertumbuhan biomassa dan pembentukan asam laktat, serta kondisi optimum rasio C/N dan laju pengadukan.

4.1 Karakterisasi Limbah Cair Tahu

Komposisi limbah cair tahu yang diperoleh dari pabrik tahu Cimahi disajikan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Komposisi limbah cair tahu

Komponen	Nilai
Nitrogen	5 g/l
Gula total	1,1 g/l
Fosfat (PO₄)	0,6 mg/l
Sulfat (SO₄)	Tidak terdeteksi

pH	3,63
----	------

Rentang komposisi media fermentasi sintetis untuk produksi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* yang disarankan oleh Jin Bo *et al.* (2005) adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1-6 g/l, KH_2PO_4 0,12-0,6 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05-0,25 g/l, dan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02-0,09 g/l dengan sumber karbon gula atau *starch*.

Dengan membandingkan komposisi limbah cair tahu dengan media fermentasi sintetis terlihat bahwa limbah cair tahu memiliki kadar nitrogen (5 g/l) yang cukup untuk mendukung produksi asam laktat. Konsentrasi nitrogen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan biomassa jauh lebih banyak dibandingkan untuk pembentukan asam laktat. Medium dengan konsentrasi nitrogen yang rendah akan menekan pertumbuhan biomassa *Rhizopus oryzae*, tetapi memicu pembentukan asam laktat. Berbeda dengan bakteri penghasil asam laktat, konsentrasi nutrisi (nitrogen dan fosfat) yang semakin tinggi akan meningkatkan produksi asam laktat (Busairi and Mat HB, 2005).

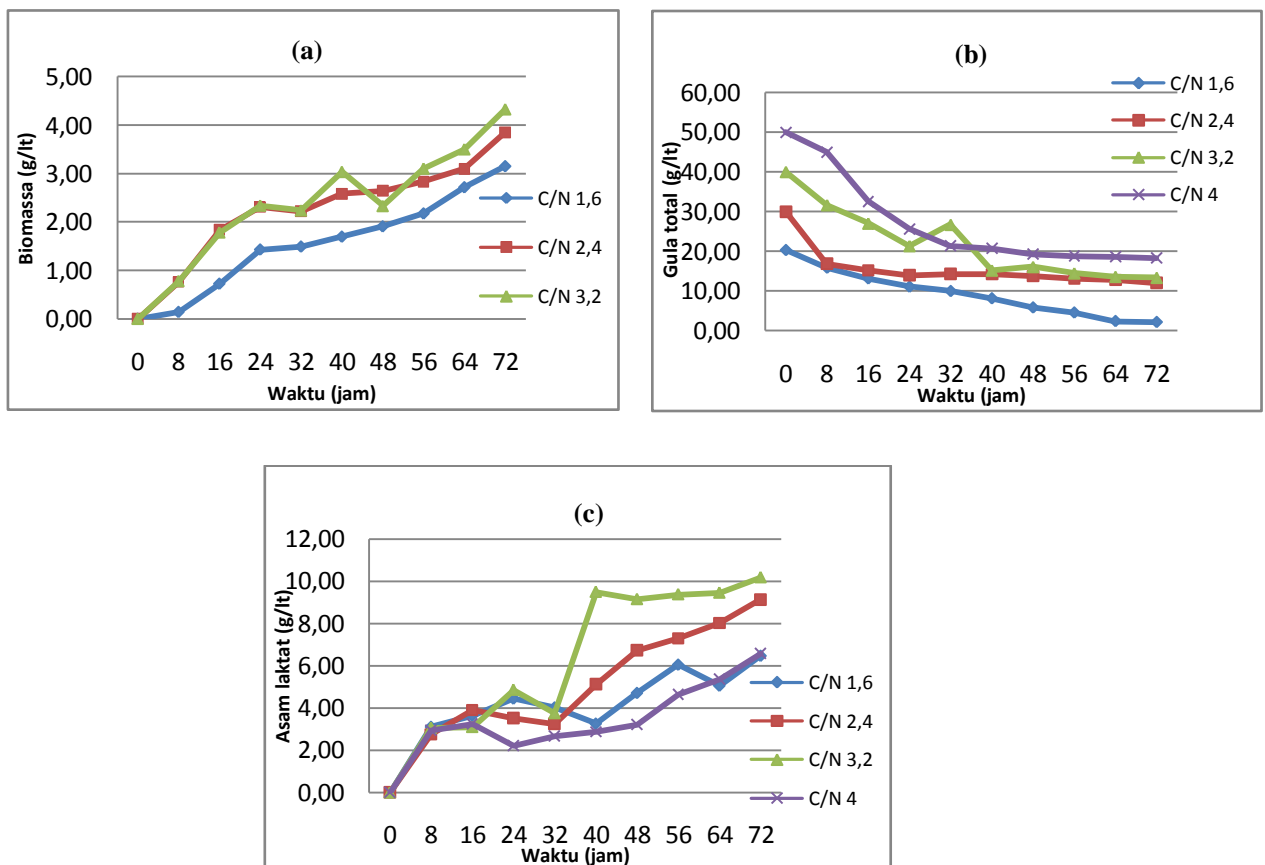
Limbah cair tahu memiliki kadar fosfat yang rendah yaitu 0,6 mg/l, ditingkatkan dengan penambahan fosfat anorganik KH_2PO_4 sebanyak 0,12 g/l. Fosfat sangat dibutuhkan dalam pertumbuhan biomassa. Fosfat berada dalam asam nukleat dan dinding sel. Sebaliknya fosfat anorganik dapat menekan sintesa beberapa metabolit sel. Konsentrasi fosfat kurang dari 1mM dapat mendukung pembentukan metabolit sekunder (Shuler and Kargi, 1992).

Kadar gula total sangat rendah yaitu 1,1 g/l sehingga harus ditambahkan sumber karbon dalam bentuk tepung tapioka. Tepung tapioka ditambahkan untuk mengimbangi dan memaksimalkan penggunaan nitrogen dalam limbah cair tahu untuk pertumbuhan biomassa dan pembentukan asam laktat. Rasio C/N yang optimum untuk fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* adalah 3,5 – 5 (Jin Bo *et al.*, 2005).

Nutrisi lain seperti $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tidak terdeteksi tetapi tidak ditambahkan dari sumber lain.

4.2 Pengaruh rasio C/N terhadap Kinetika Pertumbuhan Biomassa, Penggunaan Substrat dan Pembentukan Asam Laktat

Kinetika pembentukan biomassa *Rhizopus oryzae*, penggunaan substrat dan pembentukan asam laktat diamati pada media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu dengan berbagai rasio C/N yaitu 1,6; 2,4; 3,2 dan 4 atau pada penggunaan tepung tapioka 20 gr, 30 gr, 40 gr dan 50 gr untuk setiap liter limbah cair tahu. Waktu fermentasi dilakukan selama 72 jam. Profil kinetika pertumbuhan biomassa, penggunaan substrat dan pembentukan asam laktat ditunjukkan oleh Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Profil kinetika pertumbuhan biomassa (a), penggunaan substrat gula(b) dan pembentukan produk asam laktat (c) oleh *Rhizopus oryzae* pada berbagai rasio C/N dengan laju pengadukan 150 rpm

Dari data hubungan antara waktu fermentasi dengan konsentrasi biomassa, substrat gula total dan produk asam laktat dapat ditentukan konsentrasi biomassa akhir (X g/l), konsentrasi gula total akhir/sisa (S g/l), konsentrasi asam laktat akhir (P g/l) dan parameter kinetika yaitu laju pertumbuhan spesifik (μ , Pers. 2.2), Laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m , Pers. 2.4), konstanta saturasi (K_s , Pers. 2.4), yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$, Pers. 2.9), yield produk terhadap biomassa ($Y_{P/S}$, Pers. 2.11) dan konstanta penggunaan substrat (k_3 , Pers. 2.14). Hasil akhir proses fermentasi dan parameter kinetika disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil fermentasi dan parameter kinetika pada berbagai rasio C/N dengan laju pengadukan 150 rpm

C/N	X (g/l)	S(g/l)	P(g/l)	$\mu(\text{jam}^{-1})$	$k_3 (\text{jam}^{-1})$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$
1,6	3,16	2,12	6,47	0,036	0,031	0,169	0,273
2,4	3,85	11,93	9,15	0,018	0,008	0,182	0,415
3,2	4,33	13,37	10,19	0,020	0,015	0,131	0,393
4	-	18,24	6,59	-	0,014	-	0,107
$\mu_m = 0,046 \text{ jam}^{-1}$							
$K_s = 4,324 \text{ g/l}$							

Pertumbuhan biomassa *Rhizopus oryzae*, selama waktu fermentasi 72 jam hanya menunjukkan dua fase saja yaitu fase adaptasi dan fase eksponensial, sedangkan fase stasioner dan fase kematian tidak teramati (Gambar 4.1). Pada rasio C/N 1,6, fase adaptasi terjadi pada 8 jam pertama proses fermentasi, sedangkan pada rasio C/N 2,4 dan 3,2 fase adaptasi berlangsung singkat karena terjadi kenaikan biomassa yang cukup berarti pada 8 jam pertama proses

fermentasi. Pertumbuhan biomassa untuk semua rasio C/N masih menunjukkan kenaikan hingga jam ke-72. Konsentrasi biomassa rasio C/N 4 tidak dapat ditentukan secara akurat karena hingga jam ke-64 masih tersisa amilum yang tidak terhidrolisis.

Konsentrasi biomassa yang dihasilkan setelah 72 jam waktu fermentasi berkisar antara 3,16 - 4,33 g/l (Tabel 4.2). Konsentrasi biomassa dengan media produksi limbah pengolahan makanan berbahan baku jagung, gandum dan nenas yang diperoleh Jin Bo *et al.* (2005) yaitu 4,8 – 5,3 g/l tercapai pada jam ke- 30. Sehingga dapat dipahami jika laju pertumbuhan biomassa pada media produksi campuran tepung dan limbah cair tahu adalah 0,018 – 0,036 jam⁻¹, jauh lebih kecil dibandingkan hasil yang diperoleh Jin Bo *et al.* (2005) yaitu 0,16 - 0,25 jam⁻¹. Kadar fosfat dan nitrogen yang rendah pada limbah cair tahu menyebabkan laju pertumbuhan yang rendah. Ketiadaan nutrisi lain seperti sulfat, *magnesium* dan *zinc* juga mempengaruhi pertumbuhan sel. Selain itu kandungan amilopektin pada tepung tapioka lebih tinggi jika dibandingkan kentang dan tepung gandum sehingga akan menurunkan kecepatan proses sakarifikasi.

Laju pertumbuhan spesifik menurun dengan meningkatnya rasio C/N. Laju pertumbuhan spesifik terbesar diperoleh pada rasio C/N 1,6 yaitu 0,036 jam⁻¹. Perolehan biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$) terbesar pada rasio C/N 2,4 yaitu 0,182. Peningkatan rasio C/N dari 1,6 ke 4 diikuti dengan kenaikan viskositas media fermentasi, sehingga menghambat perpindahan oksigen ke dalam sel jamur. Penurunan kadar oksigen dalam sel akan menghambat proses biosintesis sehingga menurunkan laju pertumbuhan biomassa. Viskositas media fermentasi akan berkurang setelah semua amilum terhidrolisis menjadi glukosa, sehingga pertumbuhan biomassa meningkat kembali. Konsentrasi akhir biomassa terbesar dihasilkan pada rasio C/N 3,2 yaitu 4,33 g/l. Laju

pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m) dan K_s adalah $0,046 \text{ jam}^{-1}$ dan $4,324 \text{ g/l}$. Laju pertumbuhan maksimum $0,046 \text{ jam}^{-1}$ untuk *Rhizopus oryzae* akan tercapai pada konsentrasi substrat amilum tiga kali harga K_s .

Laju penggunaan substrat menurun dengan kenaikan rasio C/N. Kenaikan konsentrasi tepung tapioka menyebabkan kenaikan viskositas dan menghambat perpindahan oksigen ke media fermentasi dan ke dalam sel, selanjutnya akan menurunkan laju pertumbuhan biomassa, sehingga menurunkan jumlah enzim *amylase* yang dihasilkan untuk menghidrolisis tepung. Kemampuan sakarifikasi *Rhizopus oryzae* dibatasi oleh konsentrasi substrat amilum (*starch*) awal. Pada rasio C/N 1,6 - 3,2, semua amilum telah terhidrolisis sempurna pada akhir proses fermentasi. Sedangkan untuk rasio C/N 4 masih tersisa amilum yang tidak terhidrolisis. Laju penggunaan substrat spesifik terbesar diperoleh pada rasio C/N 1,6 yaitu $0,031 \text{ jam}^{-1}$. Pada rasio C/N 1,6 hampir seluruh tepung tapioka yang terhidrolisis menjadi glukosa dikonversi menjadi biomassa dan produk (gula total tersisa $2,12 \text{ g/l}$).

Asam laktat yang terbentuk dalam proses fermentasi ini diuji secara kualitatif dengan menggunakan HPLC. Waktu retensi yang diperoleh adalah 5,446 menit sesuai dengan waktu retensi L(+) asam laktat standar yaitu 5,501. Profil waktu retensi standar L(+) asam laktat dan produk dapat dilihat di Lampiran B.2. Sehingga dapat disimpulkan bahwa isomer asam laktat yang terbentuk adalah L(+) asam laktat.

Kecepatan pembentukan asam laktat konstan hingga jam ke-32 kemudian naik hingga jam ke-72. Asam laktat terbentuk pada saat pertumbuhan biomassa mulai melambat. Sehingga dapat disimpulkan bahwa asam laktat merupakan metabolit sekunder yang pola pembentukan produknya mengikuti pola campuran. Selain itu dapat dibuktikan pula bahwa *Rhizopus oryzae* memiliki karakteristik SSF (*simultaneous saccharification and*

fermentation), karena memiliki kemampuan enzimatis dan metabolik untuk mengubah amilum (*starch*) menjadi asam laktat.

Perolehan produk terhadap substrat ($Y_{P/S}$) tertinggi adalah 0,415 lebih kecil dibandingkan hasil yang didapatkan oleh Jin Bo *et al.* (2005) yaitu 0,76. Konsentrasi asam laktat akhir meningkat dengan kenaikan rasio C/N dari 1,6 ke 3,2 yaitu dari 6,47 ke 10,19 g/l, kemudian menurun pada rasio C/N 4 yaitu 6,59 g/l. Perolehan produk terhadap substrat ($Y_{P/S}$) juga meningkat dengan kenaikan rasio C/N dari 1,6 ke 3,2 yaitu 0,273 - 0,415, kemudian menurun pada rasio C/N 4 yaitu 0,107. Kekurangan oksigen dalam sel menghambat pertumbuhan sel tapi memicu pembentukan asam laktat. Semakin tinggi rasio C/N maka konsentrasi substrat karbon dalam media fermentasi semakin meningkat, sehingga konsentrasi glukosa juga bertambah.

Glukosa dalam kondisi aerob akan teroksidasi mengikuti *EMP* (*Embden-Meyerhof-Parnas*) *pathway*, menjadi *pyruvate* dan energi dalam bentuk ATP. *Pyruvate* dalam kondisi aerob akan terkonversi menjadi CO₂ dan NADH melalui siklus *Krebs/ tricarboxylic acid (TCA)*. *Pyruvate* dalam kondisi anaerob dapat terkonversi menjadi asam laktat, etanol, aseton, butanol atau asam asetat (Shuler and Kargi, 1992). Kenaikan rasio C/N akan meningkatkan viskositas media fermentasi, sehingga menurunkan konsentrasi oksigen. Oksigen dalam sel berfungsi sebagai *acceptor* elektron dari NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide*) dalam proses respirasi atau *electron transport chain* yang menghasilkan ATPs dan NAD. ATPs merupakan senyawa penyimpan energi yang diperlukan untuk proses biosintesis sedangkan NAD diperlukan untuk siklus *Krebs* (Shuler and Kargi, 1992). Jumlah oksigen yang terbatas akan menghambat pembentukan ATPs sehingga akan menurunkan proses biosintesis (pertumbuhan biomassa). Penurunan konsentrasi oksigen dalam sel memacu pembentukan asam laktat, sehingga glukosa yang terbentuk

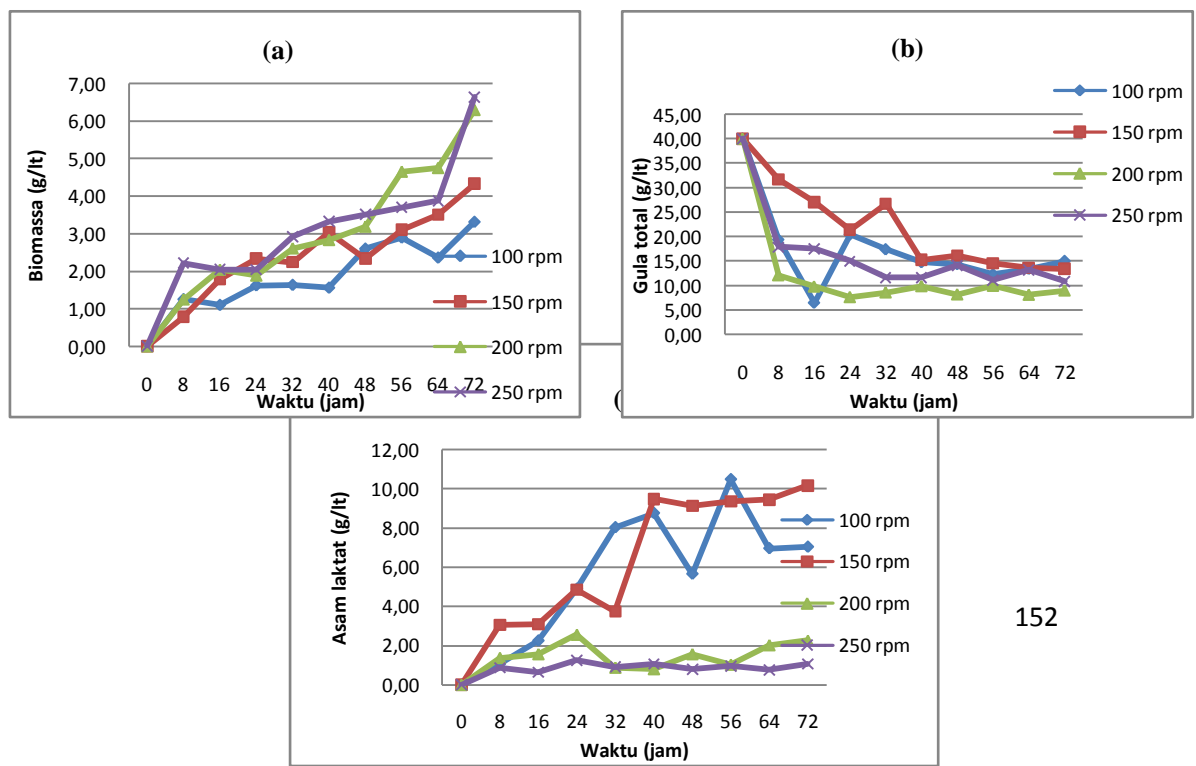
tidak digunakan untuk pembentukan biomassa tetapi untuk pembentukan asam laktat. Pada rasio C/N 4, viskositas media fermentasi sangat tinggi sehingga membatasi ketersediaan oksigen dalam media fermentasi dan menghambat proses metabolisme secara menyeluruh. Sehingga rasio C/N yang optimum untuk fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* dengan media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu adalah 2,4 – 3,2.

4.3 Pengaruh Laju Pengadukan terhadap Kinetika Pertumbuhan Biomassa, Penggunaan Substrat dan Pembentukan Asam Laktat

Karakteristik pembentukan biomassa *Rhizopus oryzae*, penggunaan substrat dan pembentukan asam laktat diamati pada media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu dengan rasio C/N 3,2 pada laju pengadukan 100, 150, 200 dan 250 rpm. Waktu fermentasi dilakukan selama 72 jam. Profil

kinetika pertumbuhan biomassa, penggunaan substrat dan pembentukan biomassa

ditunjukkan oleh Gambar 4.2. Hasil akhir fermentasi dan parameter kinetika disajikan pada Tabel 4.3.



Gambar 4.2 Profil kinetika pertumbuhan (a), penggunaan substrat gula (b) dan pembentukan produk asam laktat (c) pada rasio C/N 3,2 untuk berbagai laju pengadukan.

Pertumbuhan biomassa *Rhizopus oryzae*, selama waktu fermentasi 72 jam hanya menunjukkan dua fase saja yaitu fase adaptasi dan fase eksponensial, sedangkan fase stasioner dan fase kematian tidak teramati. Fase adaptasi berlangsung singkat karena telah terjadi kenaikan biomassa yang cukup berarti pada 8 jam pertama proses fermentasi. Sampai akhir proses fermentasi pertumbuhan biomassa untuk semua laju pengadukan masih menunjukkan kecenderungan naik.

Tabel 4.3 Hasil fermentasi dan parameter kinetika pada berbagai laju pengadukan dengan rasio C/N 3,2

Rpm	X (g/l)	S(g/l)	P(g/l)	$\mu(\text{jam}^{-1})$	$k_3 (\text{jam}^{-1})$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$
100	3,31	14,97	7,05	0,016	0,007	0,068	0,203
150	4,33	13,37	10,19	0,020	0,015	0,131	0,393
200	6,30	8,93	2,26	0,023	0,012	0,111	0,054
250	6,64	10,82	1,07	0,016	0,012	0,148	0,035
$\mu_m = 0,035 \text{ jam}^{-1}$							
$K_s = 4,380 \text{ g/l}$							

Kenaikan laju pengadukan dari 100 rpm ke 250 rpm akan meningkatkan konsentrasi biomassa akhir yaitu dari 3,31 g/l ke 6,64 g/l, laju pembentukan biomassa yaitu dari 0,016 jam⁻¹ ke 0,023 jam⁻¹, dan yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$) yaitu dari 0,068 ke 0,148 (Tabel 4.3). Laju pengadukan (agitasi) mempengaruhi kelarutan oksigen (aerasi) dalam media fermentasi. Semakin tinggi laju pengadukan semakin banyak pula oksigen yang terlarut dalam media fermentasi. Pengadukan akan meningkatkan luas permukaan perpindahan oksigen dengan cara mendispersikan udara ke dalam media fermentasi dalam bentuk gelembung-gelembung kecil. Pengadukan juga berfungsi untuk menahan terlepasnya gelembung udara dari media fermentasi, mencegah penggabungan gelembung udara dan mengurangi ketebalan film cairan pada antar muka gas/cairan dengan cara menciptakan turbulensi dalam media fermentasi (Stanbury and Whitaker, 1984). Semakin tinggi konsentrasi oksigen dalam sel akan mempercepat laju proses respirasi sehingga ATPs yang diperlukan untuk proses biosintesis semakin banyak, maka laju pertumbuhan biomassa akan meningkat.

Laju aerasi juga mempengaruhi ukuran miselia yang terbentuk. Pada laju pengadukan 100 dan 150 rpm, miselia membentuk pelet-pelet kecil yang seragam dengan ukuran 1-2 mm, sedangkan pada laju pengadukan 200 dan 250 rpm, miselia membentuk pelet-pelet besar dengan ukuran tidak seragam. Pelet-pelet kecil yang seragam memiliki efisiensi perpindahan massa lebih tinggi dibandingkan pelet-pelet besar (J.M Dominguez *et al.*, 1999).

Kenaikan laju pengadukan dari 100 rpm ke 250 rpm meningkatkan laju penggunaan substrat dari 0,007 ke 0,012 jam⁻¹ dan menurunkan gula total yang tersisa dari 14,97 ke 8,93 g/l. Semakin tinggi konsentrasi oksigen dalam sel akan mempercepat laju proses respirasi sehingga NAD yang diperlukan untuk

proses *Krebs* semakin banyak, maka laju konversi glukosa menjadi pyruvate akan meningkat.

Kenaikan laju pengadukan dari 100 rpm ke 150 rpm meningkatkan konsentrasi asam laktat akhir dari 7,05 ke 10,19 g/l. Pada laju pengadukan 200 dan 250 rpm terjadi penurunan konsentrasi asam laktat menjadi 2,26 dan 1,07 g/l. Yield produk terhadap biomassa ($Y_{P/S}$) terbesar diperoleh pada laju pengadukan 150 rpm yaitu 0,393. Peningkatan laju pengadukan menjamin ketersediaan oksigen dalam sel, kondisi tersebut justru menghambat konversi *pyruvate* menjadi asam laktat. Sehingga laju pengadukan yang optimum untuk pembentukan asam laktat adalah 150 rpm.

4.4 Optimasi Variabel Proses dengan Rancangan Percobaan *Full Factorial Central Composite Design*

Rancangan percobaan 2^2 *full factorial central composite design* digunakan untuk menentukan pengaruh dan kondisi optimum X_1 (konsentrasi amilum) dan X_2 (laju pengadukan) terhadap Y_1 (konsentrasi biomassa) dan Y_2 (konsentrasi asam laktat). Hasil percobaan yang diperoleh disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil percobaan optimasi variabel berdasarkan Rancangan percobaan 2^2 Full Factorial Central Composite Design

Run	Variabel bebas		Variabel bergantung	
	X_1	X_2	Y_1	Y_2

1	50	200	7,636	1,072
2	30	200	4,153	1,953
3	50	100	1,978	2,834
4	30	100	2,083	2,949
5	25,86	150	4,328	6,281
6	54,14	150	3,527	7,200
7	40	79,3	2,649	6,358
8	40	220,7	5,205	1,915
9	40	150	6,936	6,703
10	40	150	6,638	6,817
11	40	150	4,328	10,188
12	40	150	6,756	9,154
13	40	150	6,916	9,384

Data hasil percobaan diolah menggunakan *software Statistica 9* dengan *Response Surface Methods* sehingga diperoleh persamaan kuadratik yang menghubungkan antara variabel bebas terhadap variabel tak bebas. Pengolahan data dengan *software Statistica 9* menghasilkan pula koefisien-koefisien dari persamaan kuadratik, yang ditegaskan dengan nilai t dan nilai p untuk melihat seberapa jauh pengaruh setiap variabel bebas terhadap variabel tak bebas. Ketepatan model matematis tersebut dapat diketahui dari hasil uji ANOVA. Selain itu sejauh mana pengaruh semua variabel bebas terhadap variabel tak bebas dapat ditentukan pula dari nilai R^2 (Koefisien Diterminasi).

4.4.1 Pengaruh konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa

Persamaan kuadratik yang menghubungkan antara X_1 (konsentrasi amilum) dan X_2 (konsentrasi biomassa) terhadap Y_1 (konsentrasi biomassa) adalah :

$$Y = -17,9256 + 0,7070 X_1 + 0,0988 X_2 + 0,0018 X_1 X_2 - 0,0119 X_1^2 - 0,0005 X_2^2$$

(4.1)

Ketepatan model matematis tersebut dapat diketahui dari hasil uji ANOVA yang ditunjukkan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Uji ANOVA untuk konsentrasi biomassa

Sumber variasi	SS	df	MS	F
Regresi (model)	37,21340	5	7,442679	5,3968
Residual	9,653608	7	1,379087	
Total	46,867008	12	8,821766	
R²	0,794021			

Nilai R² (Koefisien Diterminasi) yang diperoleh adalah 0,794021, menunjukkan bahwa persamaan tersebut 79,4% mewakili hasil percobaan. Nilai R² > 75% dapat digolongkan cukup baik untuk suatu penelitian yang melibatkan mikroorganisma (Haaland, 1989). Nilai F hasil perhitungan yang ditunjukkan oleh Tabel 4.5 adalah 5,3968. Nilai F ini lebih besar dibandingkan dengan nilai F tabel (F_{0,05, 5,7} = 3,97), menunjukkan bahwa hasil regresi yang diperoleh signifikan pada level 5%.

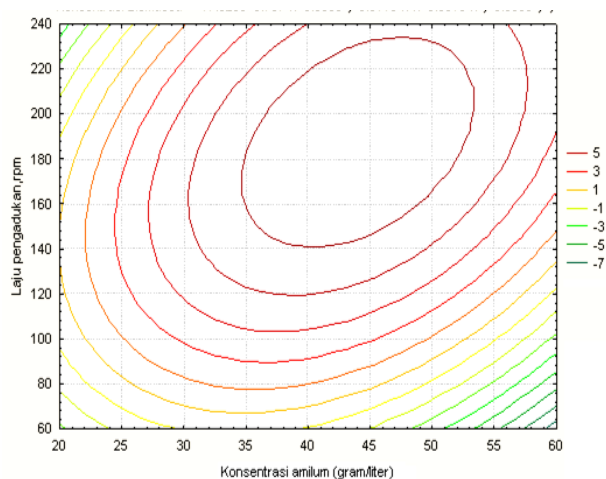
Setiap suku dalam model matematis memberikan efek yang berbeda terhadap hasil. Suku yang terdiri dari satu faktor menunjukkan efek linier, suku yang terdiri dua faktor menunjukkan efek interaksi antara dua faktor (variabel), sedangkan suku yang berpangkat dua menunjukkan efek kuadratik terhadap hasil. Signifikansi setiap suku ditentukan dari nilai p dan nilai t suatu koefisien regresi. Koefisien-koefisien persamaan kuadratik, nilai t dan nilai p disajikan pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Koefisien-koefisien persamaan kuadratik, nilai t dan nilai p untuk konsentrasi biomassa

Faktor	Koefisien	<i>t-value</i>	<i>p-value</i>
X₁	0,7070	1,76920	0,120177
X₂	0,0988	1,37967	0,210148
X₁²	-0,0119	-2,66090	0,032425
X₂²	-0,0005	-2,66147	0,032398
X₁ * X₂	0,0018	1,52766	0,170438

Suku kuadratik X_1^2 (konsentrasi amilum) dan suku kuadratik X_2^2 (laju pengadukan) dengan nilai p yaitu 0,032425 dan 0,032398 memberikan efek kuadratik cukup signifikan dengan tingkat kepercayaan 95%. Suku linier X_1 (konsentrasi amilum) dengan nilai koefisien 0,7070 memberikan efek terbesar terhadap Y_1 (konsentrasi biomassa), disusul oleh suku linier X_2 (konsentrasi biomassa) dengan nilai koefisien 0,0988, kemudian suku kuadratik X_1^2 (konsentrasi amilum) dengan nilai koefisien 0,0119, setelah itu suku interaksi $X_1 * X_2$ dengan nilai koefisien 0,0018 dan terakhir suku kuadratik X_2^2 (laju pengadukan) dengan nilai koefisien 0,0005.

Kondisi optimum konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa dapat diperkirakan dari grafik *contour* yang disajikan pada Gambar 4.3. Optimasi berdasarkan grafik *contour* adalah konsentrasi biomassa maksimum 6 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 43 g/l dan laju pengadukan 176 rpm.



Gambar 4.3 Grafik *contour* konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa

4.4.2 Pengaruh konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi asam laktat

Persamaan kuadratik yang menghubungkan antara X_1 (konsentrasi amilum) dan X_2 (konsentrasi biomassa) terhadap Y_2 (konsentrasi asam laktat) adalah :

$$Y_2 = -43,9248 + 1,3922 X_1 + 0,3487 X_2 - 0,0004 X_1 X_2 - 0,0166 X_1^2 - 0,0012 X_2^2 \quad (4.2)$$

Ketepatan model matematis tersebut dapat diketahui dari hasil uji ANOVA yang ditunjukkan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Uji ANOVA untuk konsentrasi asam laktat

Sumber variasi	SS	df	MS	F
Regresi (model)	83,09387	5	16,61877	3,4988
Error	33,24856	7	4,749795	
Total	116,34243	12	21,368565	

R²	0,714218
----------------------	----------

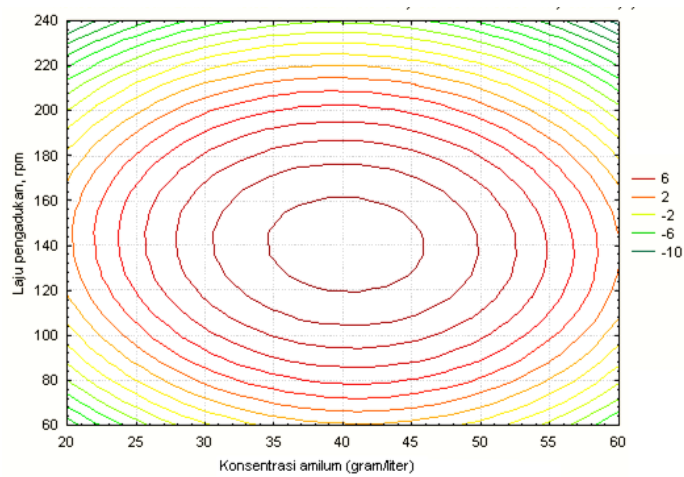
Nilai R^2 (Koefisien Diterminasi) yang diperoleh adalah 0,714218, menunjukkan bahwa persamaan tersebut 71,4% mewakili hasil percobaan. Nilai R^2 lebih kecil dari 75% disebabkan oleh sulitnya menjaga/mempertahankan variabel tetap seperti volum inokulum yang ditambahkan dalam media produksi. Nilai F yang ditunjukkan oleh Tabel 4.7 adalah 3,4988. Nilai F ini lebih kecil dibandingkan dengan nilai F tabel ($F_{0,05, 5,7} = 3,97$) menunjukkan bahwa hasil regresi yang diperoleh tidak signifikan pada level 5%.

Koefisien-koefisien persamaan kuadrat, nilai t dan nilai p disajikan pada Tabel 4.8. Suku kuadrat X_2^2 (laju pengadukan) dan suku linier X_2 (laju pengadukan) dengan nilai p 0,008869 dan 0,034274 memberikan efek cukup signifikan dengan tingkat kepercayaan 95%. Suku linier X_1 (konsentrasi amilum) dengan nilai koefisien 1,3922 memberikan efek terbesar terhadap Y_2 (konsentrasi asam laktat), disusul oleh suku linier X_2 (konsentrasi biomassa) dengan nilai koefisien 0,3487, kemudian suku kuadrat X_1^2 (konsentrasi amilum) dengan nilai koefisien 0,0166, setelah itu suku kuadrat X_2^2 (laju pengadukan) dengan nilai koefisien 0,0012 dan terakhir suku interaksi $X_1 * X_2$ dengan nilai koefisien 0,0004.

Tabel 4.8 Koefisien-koefisien persamaan kuadrat, nilai t dan nilai p untuk konsentrasi asam laktat

Faktor	Koefisien	t-value	p-value
X_1	1,3922	1,87724	0,102582
X_2	0,3487	2,62270	0,034274
X_1^2	-0,0166	-2,01292	0,084003
X_2^2	-0,0012	-3,58898	0,008869
$X_1 * X_2$	-0,0004	-0,17574	0,865477

Kondisi optimum konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi asam laktat dapat diperkirakan dari grafik *contour* yang disajikan pada Gambar 4.4. Optimasi berdasarkan grafik *contour* adalah konsentrasi asam laktat maksimum 8,26 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 40 g/l dan laju pengadukan 139 rpm.



Gambar 4.4 Grafik *contour* konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi asam laktat

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae* dengan media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu adalah:

1. Limbah cair tahu memiliki kandungan nitrogen yang mencukupi untuk pembentukan asam laktat yaitu 5 g/l. Kandungan karbon dalam limbah cair tahu relatif sedikit yaitu 1,1 g/l, sehingga harus dilakukan penambahan unsur C dari sumber lain.
2. Rasio C/N relatif optimum untuk fermentasi asam laktat adalah 2,4-3,2. Laju pengadukan relatif optimum untuk pembentukan asam laktat adalah 150 rpm.
3. Laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m) adalah $0,046 \text{ jam}^{-1}$, konstanta saturasi (K_s) adalah 4,324 g/l dan laju penggunaan substrat spesifik (k_3) tertinggi adalah $0,031 \text{ jam}^{-1}$. Yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$) tertinggi adalah 0,182 dan yield asam laktat terhadap substrat ($Y_{P/S}$) tertinggi adalah 0,415.
4. Konsentrasi biomassa maksimum adalah 6 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 43 g/l dan laju pengadukan 176 rpm. Konsentrasi asam laktat maksimum adalah 8,26 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 40 g/l dan laju pengadukan 139 rpm.

5.2 Saran

Beberapa saran yang dapat memperbaiki dan mengembangkan materi penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan kajian tentang pengaruh penambahan nutrisi lain seperti unsur P, Mg dan Zn ke dalam limbah cair tahu untuk meningkatkan potensinya sebagai media produksi asam laktat.
2. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang penggunaan dua reaktor yang terpisah untuk pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat. Kedua reaktor tersebut memiliki kondisi operasi dan komposisi nutrien yang berbeda.
3. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang pengaruh kandungan amilopektin dalam tepung tapioka terhadap proses sakarifikasi *starch*.

BAB VI

RINGKASAN

Campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu dapat digunakan sebagai alternatif media fermentasi yang murah untuk menghasilkan asam laktat dengan menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*. *Rhizopus oryzae* memiliki kemampuan melakukan proses sakarifikasi dan fermentasi secara berkesinambungan (SSF, *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) dalam satu tahap. Sel *Rhizopus* dapat menghasilkan 1,5 mol asam laktat dari 1 mol glukosa dalam kondisi aerobik dan sisanya diubah menjadi miselia, *glycerol*, *fumarate* atau etanol [Skory, 2000]. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari karakteristik dari tepung tapioka dan limbah cair tahu sebagai media fermentasi asam laktat oleh jamur *Rhizopus oryzae*, mempelajari pengaruh rasio C/N dan laju pengadukan terhadap pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat, menentukan parameter kinetika proses fermentasi asam laktat yaitu laju pertumbuhan spesifik (μ), laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m), tetapan kejenuhan substrat (K_s), konstanta penggunaan substrat (k_3), perolehan/yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$) dan perolehan/yield produk terhadap substrat ($Y_{P/S}$), menentukan konsentrasi amilum dan laju pengadukan optimum untuk pertumbuhan biomassa dan produksi asam laktat. Teori tentang fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae*, faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan biomassa dan pembentukan asam laktat dan teknik optimasi variabel proses dijelaskan pada BAB I dan BAB II.

Proses fermentasi dilakukan secara batch dalam erlemeyer 250 ml dengan volume media produksi 100 ml. Media produksi kemudian diinokulasi dengan 7 ml inokulum, dan ditempatkan dalam *Incubator shaker* dengan suhu 30°C , $\text{pH} \pm 6$, dan waktu fermentasi 72 jam. Dari percobaan tersebut diperoleh profil, parameter kinetika dan rasio C/N dan laju pengadukan relatif optimum. Selain itu dilakukan pula penelitian dengan rancangan percobaan *2² full factorial composite design* dan pengolahan data dengan *Response Surface Methods* untuk mendapatkan pengaruh dan kondisi optimum konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa dan asam laktat. Metodologi penelitian, bahan, alat, prosedur, dan metoda analisa dijelaskan pada BAB III.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa limbah cair tahu memiliki kandungan nitrogen yang mencukupi untuk pembentukan asam laktat yaitu 5 g/l, kandungan karbon relatif sedikit yaitu 1,1 g/l, sehingga harus dilakukan penambahan unsur C dari sumber lain. Rasio C/N relatif optimum untuk pertumbuhan biomassa dan pembentukan asam laktat adalah 2,4-3,2. Laju pengadukan relatif optimum untuk pertumbuhan biomassa dan pembentukan asam laktat adalah 150 rpm, μ_m adalah $0,046 \text{ jam}^{-1}$, K_s adalah 4,324 g/l, k_3 tertinggi adalah $0,031 \text{ jam}^{-1}$, $Y_{X/S}$ tertinggi adalah 0,182 dan $Y_{P/S}$ tertinggi adalah 0,415. Konsentrasi biomassa maksimum adalah 6 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 43 g/l dan laju pengadukan 176 rpm. Konsentrasi asam laktat maksimum adalah 8,26 g/l diperoleh pada konsentrasi amilum 40 g/l dan laju pengadukan 139 rpm. Hasil penelitian, pembahasan, kesimpulan dan saran dijelaskan secara lengkap pada BAB IV dan BAB V.

DAFTAR PUSTAKA

- Bailey James E, David F. Ollis, *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, New York, 1987.
- Busairi A.M, dan Mat H.B, *Recycling of Pineapple Waste Using Lactobacillus delbroeckii to Lactic Acid*, Proceeding, Second International Seminar on Enviromental Chemistry and Toxicology, April 26 – 27, 2005, Jogyakarta, Indonesia.
- Busairi Abdullah Moch., *Lactic Acid Fermentation of Pineapple Wastes by Lactobacillus delbrueckii*, Universiti Teknologi Malaysia, 2002.
- Efremenko E., O. Spiricheva, S. Varfolomeyev, V. Lozinsky, *Rhizopus oryzae Fungus Ccells Producing L (+)-Lactic Acid:Kinetic and Metabolic Parameters of Free and PVA-cryogel-entrapped Mycelium*, Appl Microbial Biotechnol (2006) 72: 480-485, USA.
- Ghofar Abdul, Shingo Ogawa dan Takao Kokugan, *Production of L-lactic Acid from Fresh Cassava Roots Shurried with Tofu Liquid Waste by Streptococcus bovis*. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100, No.6, 606-612, 2005, The Society for Biotechnology, Japan.
- Greasham Randolp L., *Media for Microbial Fermentasi*, in Biotechnology, Vol.3 Bioprocessing,ed. G. Stephanopoulos, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim, Federal Republic of German, 1993.
- Haaland, Perry D, *Experimental Design in Biotechnology*, Marcel Dekker, Inc.,New York, 1989.
- Hartono Liesbetini, Ani Suryani dan Erliza, *Rekayasa Proses Produksi Asam Polilaktat (PLA) dari Pati Sagu sebagai Bahan Baku Plastik Biodegradable*, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor, 2005, Bogor

- Hua Li Ping, Bo Jin, Lant Paul, *Direct Fermentation of Potato Starch Wastewater to Lactic Acid By Rhizopus oryzae and Rhizopus arrhizus*, Bioprocess and Biosystem Engineering, Vol. 27, pp. 229-238, 2005, Australia
- Jin Bo, Pinghe Yin, Yibong Ma, Ling Zha O, *Production of Lactic Acid and Fungal Biomassa by Rhizopus Fungi from Food Processing Waste Streams*, Jurnal Ind. Microbiol. Biotechnol ,2005, 32 : 678 – 686, Enviromental Biotechnology, Australia.
- Jin Bo, Li Ping Hua, Paul Lant, *Rhizopus arrhizus, A Producer for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Starch Wastes Materials to L(+) Lactic Acid*, Biotechnology Letters 25, Netherland, 2003.
- J. M Dominguez, dan Vazquez, M, *Effect of the Operational Condition on Lactic Acid Production by Rhizopus oryzae*, Cienc.Tecnol. Alinment. Vol.2, No.3. (113-118), 1999, Galicia, Spanyol
- Koide Mitchiteru, Makoto Hirata, Min-tian Gao, Eiichi Toorisaka, Hirokazu Takanashi dan Tadashi Hano, *L-Lactic Acid Fermentation by Rhizopus oryzae with Activated Carbon Addition* Departement of Applied Chemistry, Oita University, Dannoharu, 700, Oita 870-1192, Japan dan Departement of Bioengineering, Kagoshima University, Kagoshima 890-0065, Japan, 2002.
- Lazic, R Zivorad, *Design of Eksperiments in Chemical Engineering*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinhein, Federal Republic of Germany, 2004.
- Lehninger Albert L., terj. Maggy Thenawidjaja, *Dasar-dasar Biokimia jilid 1*, Erlangga, Jakarta, 1988.

- Maas Ronald H. W., Robert R. Bakker, Gerrit Eggink, Ruud A. Weusthuis, *Lactic acid Production from Xylose by the Fungus Rhizopus oryzae*, Appl Microbiol Biotechnol (2006) 72: 861-868, USA.
- Mangunwidjaja Djumali, Ani Suryani, *Teknologi Bioproses*, Penebar Swadaya, Jakarta, 1994.
- Narayanan Niju, Pradip K. Roychoudhury, Aradhana Srivastana, *L(+)Lactic acid Fermentation and Its Product Polymerization*, Electronic Journal of Biotechnology, Chile, 2004.
- Oda Yuji, Katsuichi Saito, Hiroaki Yamauchi dan Motoyuki Mori, *Lactic Acid Fermentation of Potato Pulp by Fungus Rhizopus oryzae*, Journal Current Microbiology, Biomedical and Life Sciences, Vol. 45, pp. 1-4, 2002, New York.
- Payot T, M.Fick, *On-line Estimation of Lactic Acid Concentration by Conductivity measurement in Fermentation Broth*, Biotechnology Technicites Vol. 11, 1997 pp 17-20.
- Purwoko Tjahjadi dan Idayu Ria Pramudyanti, *Pengaruh CaCO_3 pada Fermentasi Asam Laktat oleh Rhizopus oryzae*, Jurnal Mikrobiologi Indonesia, Vol 9, 2004.
- Rossiana Nia MS, *Uji Toksisitas Limbah Cair Tahu Sumedang terhadap Reproduksi Daphnia carinata King*, Laporan Penelitian, Universitas Padjadjaran, 2006.
- Ruengruglikit C. dan Y.D. Hang, *Production of L(+)-lactic acid by Rhizopus oryzae from Corn Cobs*, Annual Meeting and Food Expo- Anaheim, 2002, California,
- Saito K., Y. Kawamura, Y. Oda, *Role of The Pectinolytic Enzyme in the Lactic Acid Fermentation of Potato Pulp by Rhizopus oryzae*, Journal Ind. Microbiol. Biotechnol (2003) 30: 440-444, Australia.

- Shuler Michael L., Fikret Kargi, *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, Prentice-Hall International Inc., New Jersey, 1992.
- Skory Christopher D., *Isolation and Expression of Lactate Dehydrogenase Genes oryzae*, Applied and Enviromental Microbiology, 2000 June, 66(6): 2343-2348, USA.
- Stanbury Peter F., Allan Whitaker, *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press, New York, 1984.
- Tay Abdullatif dan Shang-Tian Yang, *Production of L(+)-lactic Acid from Glucose and Starch by Immobilized Cells of Rhizopus oryzae in Rotating Fibrous Bed Bioreactor*. Journal Biotechnology and Bioengineering , Vol.80, pp. 1-12, 2002, USA.
- Tjokroadikoesoemo P. Soebijanto, *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*, PT Gramedia, Jakarta, 1986.
- US Patent 6849444, *Strain of Rhizopus oryzae and Use Thereof*, , Expire date April 23 2022, 2005.
- Vickroy, T.B *Lactic Acid*, University of California, CA, USA, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol.3, ed. Moo Young, Pergamon Press, New York, 1985
- Yuwono Suropto Dwi, Sutopo Hadi, *Production of Lactic Acid from Onggok and Tofu Liquid Waste with Concentrate Maguro Waste Supplement by Streptococcus bovis*, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2(4) : 939-942, 2008, Australia.

Lampiran A Prosedur Uji Sampel Percobaan

A.1 Prosedur Uji Konsentrasi Biomassa

1. 100 ml sampel diperoleh dari satu erlemeyer yang mewakili satu interval waktu fermentasi disentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit.
2. Endapan yang diperoleh dicuci dua kali dengan 4 N HCl untuk menghilangkan sisa kalsium karbonat.
3. Kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 40.
4. Biomassa yang diperoleh dikeringkan pada suhu 60⁰C selama 36 jam dan ditimbang.

A.2 Prosedur Uji konsentrasi Gula Total/tereduksi

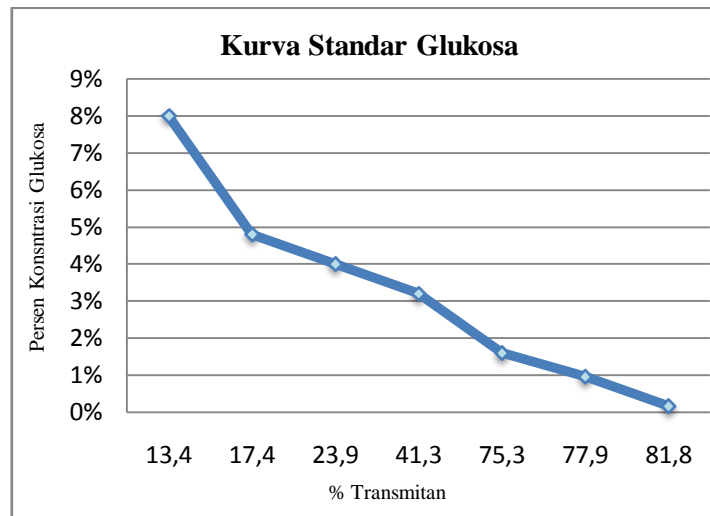
A.2.1 Hidrolisis amilum

1. 2,5 ml HCl 2 N ditambahkan pada 5 ml sampel
2. Panaskan dalam penangas air mendidih selama 60 menit
3. Uji dengan larutan KI, jika larutan berwarna kuning jernih maka proses hidrolisis telah berlangsung sempurna.

A.2.2 Analisa glukosa

1. Reagen DNS (Dinitro Salysilic Acid) dibuat dengan melarutkan 100 mg DNS dalam 1000 ml aquades.
2. 1 ml reagen DNS, 2 ml aquadest dan 0,5 ml KOH ditambahkan pada tabung reaksi yang telah berisi 1 ml sampel hasil hidrolisis amilum.
3. Tabung reaksi dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dan DNS.
4. Tabung reaksi didinginkan, kemudian ditambahkan aquadest hingga mencapai volume 10 ml, dikocok agar tercampur merata.

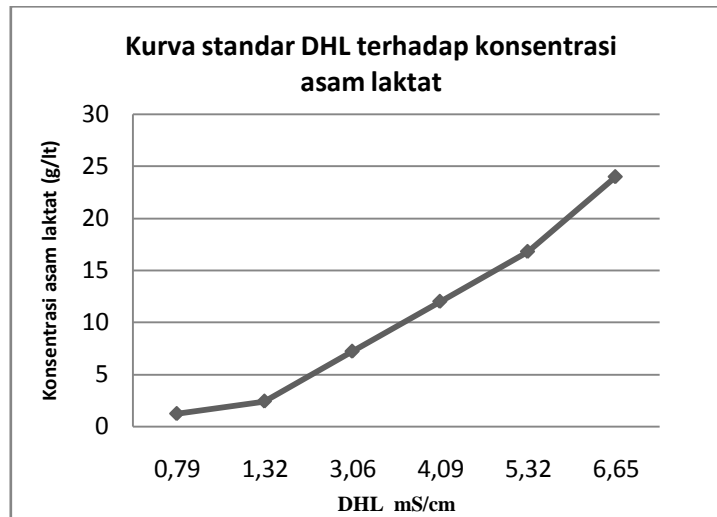
5. Absorbansi/persen transmitan larutan diukur pada panjang gelombang 540 nm (Ceirwyn, 1995)
6. Plotkan pada kurva standar. Persamaan regresi linier kurva standar adalah $y = -0,79817x + 70,4277$



Gambar A1.1 Kurva standar glukosa

A.3 Prosedur Uji Konsentrasi Asam Laktat

1. Supernatan hasil proses sentrifugasi untuk penentuan konsentrasi biomassa disentrifugasi kembali pada 10000 rpm selama 10 menit.
2. Supernatan yang terbentuk dianalisa dengan HPLC (Jin Bo *et al.*, 2005) untuk menentukan jenis isomer asam laktat.
3. Sebagian supernatan dianalisa dengan *Conductometer* untuk menentukan daya hantar listriknya, kemudian diplotkan pada kurva standar DHL terhadap konsentrasi asam laktat (Payot, 1997). Persamaan regresi linier kurva standar adalah $y = 3,8341x - 2,9662$



Gambar A1.2 Kurva standar DHL terhadap konsentrasi asam laktat

Lampiran C Data Percobaan dan Pengolahan Data

C.1 Perhitungan rasio C/N

1. Asumsi 1 gram amilum akan terhidrolisa sempurna menjadi kurang lebih 1 gram glukosa (Jin Bo *et al.*, 2005)
2. Konsentrasi N dalam limbah cair tahu : 5 g/l
3. Fraksi massa C dalam glukosa $C_6H_{12}O_6$: $72/180 = 0,4$
4. 20 g/l amilum jika terhidrolisis sempurna setara dengan 20 g/l glukosa, mengandung 8 g/l C.
5. Rasio $C/N = 8/5 = 1,6$

C.2 Perhitungan parameter kinetika

Contoh data percobaan dan pengolahan data disajikan pada Tabel C.1

C.2.1 Perhitungan laju pertumbuhan spesifik (μ)

Laju pertumbuhan spesifik (μ) diperoleh dengan mengalurkan $\ln X$ terhadap t (waktu) sesuai dengan persamaan (2.2) yaitu :

$$\ln X = \mu t + \ln X_0$$

μ adalah slope yang terbentuk dari persamaan linier tersebut. Sehingga diperoleh $\mu = 0,036 \text{ jam}^{-1}$.

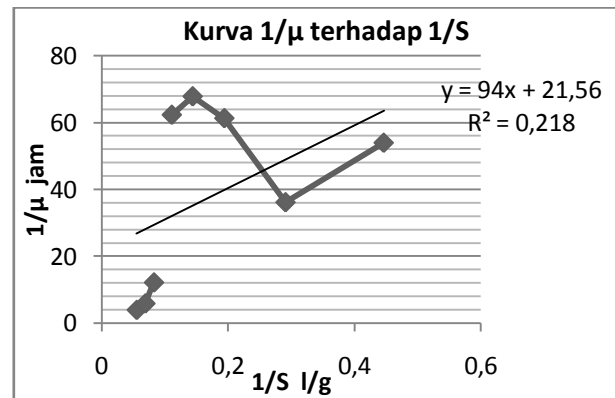
C.2.2 Laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m)

Laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_m) diperoleh dengan mengalurkan $1/\mu$ terhadap $1/S$ sesuai dengan persamaan (2.4) yaitu :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{Ks}{\mu m} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu m}$$

$1/\mu_m$ adalah intercept dan K_s/μ_m adalah slope yang terbentuk dari persamaan linier tersebut.

Sehingga diperoleh $\mu_m = 0,046 \text{ jam}^{-1}$ dan $K_s = 4,324 \text{ g/l}$



Gambar C.1 Kurva $1/\mu$ terhadap $1/S$ untuk konsentrasi amilum 20 g/l, 150 rpm

C.2.3 Perhitungan konstanta penggunaan substrat (k_3)

Konstanta penggunaan substrat (k_3) diperoleh dengan mengalurkan $\ln S_t/S_0$ terhadap t (waktu) sesuai dengan persamaan (2.4) yaitu :

$$-\frac{dS}{dt} = k_3 S$$

k_3 adalah slope dari persamaan liniernya. Sehingga diperoleh $k_3 = 0,031 \text{ jam}^{-1}$.

C.2.4 Perhitungan perolehan/yield biomassa terhadap substrat ($Y_{X/S}$)

$Y_{X/S}$ dihitung dengan persamaan (2.9) yaitu :

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S$$

$$Y_{X/S} = (X_t - X_0) / (S_0 - S_t)$$

Dengan mengalurkan $(X_t - X_0)$ terhadap $(S_0 - S_t)$ diperoleh $Y_{X/S} = 0,169$

C.2.5 Perhitungan perolehan/yield produk asam laktat terhadap substrat ($Y_{P/S}$)

$Y_{P/S}$ dihitung dengan persamaan (2.11) yaitu :

$$Y_{P/S} = \Delta P / \Delta S$$

$$Y_{P/S} = (P_t - P_0) / (S_0 - S_t)$$

Dengan mengalurkan $(P_t - P_0)$ terhadap $(S_0 - S_t)$ diperoleh $Y_{P/S} = 0,273$

C.3 Perhitungan Optimasi Variabel dengan *Response Surface Methods*

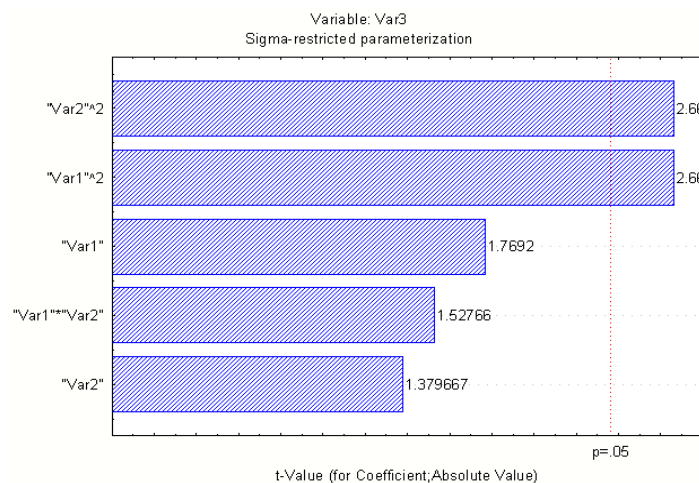
C.3.1 Optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa

Tabel C.2 Koefisien-koefisien persamaan polynomial, nilai t dan nilai p untuk optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa

Effect	Parameter Estimates (Spreadsheet4 in data) Sigma-restricted parameterization							
	Var3 Param.	Var3 Std.Err	Var3 t	Var3 p	-95.00% Cnf.Lmt	+95.00% Cnf.Lmt	Var3 Beta (β)	Var3 St.Err. β
Intercept	-17.9256	11.02795	-1.62547	0.148090	-44.0026	8.151356		
"Var1"	0.7070	0.39961	1.76920	0.120177	-0.2379	1.651899	2.92070	1.650859
"Var1"^2	-0.0119	0.00445	-2.66090	0.032425	-0.0224	-0.001319	-3.94341	1.481980
"Var2"	0.0988	0.07163	1.37967	0.210148	-0.0706	0.268219	2.04147	1.479683
"Var2"^2	-0.0005	0.00018	-2.66147	0.032398	-0.0009	-0.000053	-2.97382	1.117361
"Var1"*"Var2"	0.0018	0.00117	1.52766	0.170438	-0.0010	0.004571	1.87129	1.224941

Tabel C.3 Uji ANOVA persamaan polynomial untuk optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa

Dependnt Variable	Test of SS Whole Model vs. SS Residual (Spreadsheet4 in data)								
	Multiple R	Multiple R ²	Adjusted R ²	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual
Var3	0.891079	0.794021	0.646894	37.21340	5	7.442679	9.653608	7	1.379087



Gambar C.2 Grafik Pareto untuk optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi biomassa

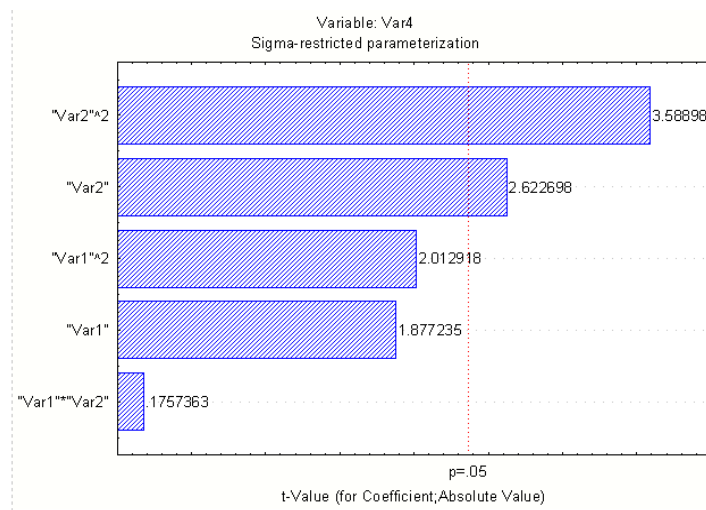
C.3.1 Optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi asam laktat

Tabel C.4 Koefisien-koefisien persamaan polynomial, nilai t dan nilai p untuk optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi asam laktat

Effect	Parameter Estimates (Spreadsheet4 in data) Sigma-restricted parameterization							
	Var4 Param.	Var4 Std.Err	Var4 t	Var4 p	-95.00% Cnf.Lmt	+95.00% Cnf.Lmt	Var4 Beta (β)	Var4 St.Err.β
Intercept	-43.9248	20.46616	-2.14621	0.068998	-92.3195	4.470022		
"Var1"	1.3922	0.74161	1.87724	0.102582	-0.3615	3.145787	3.65036	1.944537
"Var1" ²	-0.0166	0.00826	-2.01292	0.084003	-0.0362	0.002907	-3.51378	1.745615
"Var2"	0.3487	0.13294	2.62270	0.034274	0.0343	0.663024	4.57112	1.742909
"Var2" ²	-0.0012	0.00033	-3.58898	0.008869	-0.0020	-0.000405	-4.72357	1.316132
"Var1"*"Var2"	-0.0004	0.00218	-0.17574	0.865477	-0.0055	0.004770	-0.25356	1.442850

Tabel C.5 Uji ANOVA persamaan polynomial untuk optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi asam laktat

Dependnt Variable	Test of SS Whole Model vs. SS Residual (Spreadsheet4 in data)								
	Multiple R	Multiple R ²	Adjusted R ²	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual
Var4	0.845114	0.714218	0.510088	83.09387	5	16.61877	33.24856	7	4.749795



Gambar C.3 Grafik Pareto untuk optimasi konsentrasi amilum dan laju pengadukan terhadap konsentrasi asam laktat

Lampiran B Data Analisa Sampel

B.1 Analisa limbah cair tahu

B.2 Analisa jenis isomer asam laktat

Tabel C.1 Data percobaan dan pengolahan data pada konsentrasi amilum 20 g/l, 150 rpm

No.	Waktu (jam)	Biomassa (g/l)	Konsentrasi gula total %T (g/l)	Konsentrasi asam laktat DHL (mS/cm) (g/l)	Ln Xt	(S
t0	0	0.00	62.8	20.31	1.8	3.92
t1	8	0.14	68.4	15.84	2.61	7.03
t2	16	0.73	71.8	13.13	2.75	7.56
t3	24	1.43	74.4	11.06	2.96	8.37
t4	32	1.49	75.8	9.94	2.85	7.95
t5	40	1.70	78.1	8.10	2.65	7.18
t6	48	1.91	81	5.79	3.03	8.63
t7	56	2.18	82.6	4.51	3.38	9.98
t8	64	2.72	85.3	2.36	3.12	8.98
t9	72	3.16	85.6	2.12	3.49	10.40

X rata2	ΔX	$\Delta X/\Delta t$	S rata2	ΔS	$\Delta S/\Delta t$	P rata2	ΔP	$\Delta P/\Delta t$	μ
0.0705	0.14	0.017625	18.079	4.47	0.5586	1.55115	3.10	0.387788	0.25
0.433	0.584	0.073	14.488	2.7132	0.33915	3.3704	0.5362	0.067025	0.168591
1.0785	0.707	0.088375	12.094	2.0748	0.25935	4.04065	0.8043	0.100538	0.081943
1.4625	0.061	0.007625	10.498	1.1172	0.13965	4.23215	-0.4213	-0.05266	0.005214
1.5955	0.205	0.025625	9.0217	1.8354	0.229425	3.6385	-0.766	-0.09575	0.016061
1.8045	0.213	0.026625	6.9469	2.3142	0.289275	3.9832	1.4554	0.181925	0.014755
2.0445	0.267	0.033375	5.1514	1.2768	0.1596	5.38115	1.3405	0.167563	0.016324
2.449	0.542	0.06775	3.4357	2.1546	0.269325	5.5535	-0.9958	-0.12448	0.027664
2.938	0.436	0.0545	2.2387	0.2394	0.029925	5.76415	1.4171	0.177138	0.01855

Tabel C.2 Data percobaan dan pengolahan data pada konsentrasi amilum 30 g/l, 150 rpm

No.	Waktu (jam)	Biomassa (g/l)	Konsentrasi gula total %T (g/l)	Konsentrasi asam laktat DHL (mS/cm) (g/l)	Ln Xt	(So - S
t0	0	0.00	30.00	1.80	3.92	
t1	8	0.76	67.2	16.80	2.52	6.68
t2	16	1.84	69.3	15.13	2.82	7.83

t3	24	2.31	70.8	13.93	2.72	7.45	0.84
t4	32	2.22	70.4	14.25	2.65	7.18	0.80
t5	40	2.58	70.5	14.17	3.14	9.06	0.95
t6	48	2.64	71.1	13.69	3.56	10.66	0.97
t7	56	2.83	71.9	13.05	3.71	11.24	1.04
t8	64	3.09	72.3	12.73	3.90	11.97	1.13
t9	72	3.85	73.3	11.93	4.19	13.08	1.35

X rata2	ΔX	$\Delta X/\Delta t$	S rata2	ΔS	$\Delta S/\Delta t$	P rata2	ΔP	$\Delta P/\Delta t$	μ
0.382	0.764	0.0955	23.4011	13.1978	1.649725	1.3788	2.7576	0.3447	0.25
1.3015	1.075	0.134375	15.9643	1.6758	0.209475	3.3321	1.149	0.143625	0.103246
2.073	0.468	0.0585	14.5279	1.197	0.149625	3.7151	-0.383	-0.04787	0.02822
2.264	-0.086	-0.01075	14.089	-0.3192	-0.0399	3.38955	-0.2681	-0.03351	-0.00475
2.401	0.36	0.045	14.2087	0.0798	0.009975	4.19385	1.8767	0.234588	0.018742
2.611	0.06	0.0075	13.9294	0.4788	0.05985	5.9365	1.6086	0.201075	0.002872
2.737	0.192	0.024	13.3708	0.6384	0.0798	7.02805	0.5745	0.071813	0.008769
2.9625	0.259	0.032375	12.892	0.3192	0.0399	7.67915	0.7277	0.090962	0.010928
3.471	0.758	0.09475	12.3334	0.798	0.09975	8.59835	1.1107	0.138838	0.027298

Tabel C.3 Data percobaan dan pengolahan data pada konsentrasi amilum 40 g/l, 150 rpm

No.	Waktu (jam)	Biomassa (g/l)	Konsentrasi gula total		Konsentrasi asam laktat		Ln Xt	(So
			%T	(g/l)	DHL (mS/cm)	(g/l)		
t0	0	0.00		40.00	1.80	3.92	#NUM!	(g
t1	8	0.78	48.6	31.65	2.60	6.99	-0.25	
t2	16	1.79	54.4	27.02	2.61	7.03	0.58	
t3	24	2.34	61.5	21.35	3.07	8.79	0.85	
t4	32	2.24	54.8	26.70	2.78	7.68	0.81	
t5	40	3.04	69.2	15.21	4.28	13.42	1.11	
t6	48	2.33	68.1	16.08	4.19	13.08	0.85	
t7	56	3.10	70.1	14.49	4.25	13.31	1.13	
t8	64	3.50	71.2	13.61	4.27	13.38	1.25	
t9	72	4.33	71.5	13.37	4.46	14.11	1.47	

X rata2	ΔX	$\Delta X/\Delta t$	S rata2	ΔS	$\Delta S/\Delta t$	P rata2	ΔP	$\Delta P/\Delta t$	μ
0.3905	0.781	0.097625	35.8225	8.355	1.044375	1.532	3.064	0.383	0.25
1.283	1.004	0.1255	29.3308	4.6284	0.57855	3.08315	0.0383	0.004787	0.097818
2.062	0.554	0.06925	24.1837	5.6658	0.708225	3.9832	1.7618	0.220225	0.033584
2.289	-0.1	-0.0125	24.0241	-5.3466	-0.66833	4.30875	-1.1107	-0.13884	-0.00546
2.637	0.796	0.0995	20.9518	11.4912	1.4364	6.6259	5.745	0.718125	0.037732
2.6825	-0.705	-0.08813	15.6451	-0.8778	-0.10973	9.32605	-0.3447	-0.04309	-0.03285
2.7165	0.773	0.096625	15.286	1.596	0.1995	9.2686	0.2298	0.028725	0.03557
3.3025	0.399	0.049875	14.0491	0.8778	0.109725	9.4218	0.0766	0.009575	0.015102
3.915	0.826	0.10325	13.4905	0.2394	0.029925	9.82395	0.7277	0.090963	0.026373

Tabel C.4 Data percobaan dan pengolahan data pada konsentrasi amilum 50 g/l, 150 rpm

No.	Waktu	Biomassa	Konsentrasi gula total		Konsentrasi asam laktat		Ln Xt	(So
	(jam)	(g/l)	%T	(g/l)	DHL (mS/cm)	(g/l)		
t0	0		25.1	50.00	1.80	3.92		(g
t1	8		31.9	44.97	2.57	6.87		
t2	16		47.5	32.52	2.65	7.18		
t3	24		56.2	25.58	2.38	6.15		
t4	32		61.5	21.35	2.50	6.61		
t5	40		62.3	20.71	2.55	6.80		
t6	48		64.2	19.20	2.64	7.14		
t7	56		64.7	18.80	3.01	8.56		
t8	64		65	18.56	3.20	9.29		
t9	72		65.4	18.24	3.52	10.51		

Tabel C.5 Data percobaan dan pengolahan data pada konsentrasi amilum 40 g/l, 100 rpm

No.	Waktu (jam)	Biomassa (g/l)	Konsentrasi gula total		Konsentrasi asam laktat		Ln Xt
			%T	(g/l)	DHL (mS/cm)	(g/l)	
t0	0	0.00		40.00	1.80	3.92	
t1	8	1.25	64.00	19.36	2.08	5.00	0.22
t2	16	1.10	80.20	6.43	2.39	6.18	0.09
t3	24	1.62	62.70	20.39	3.08	8.83	0.48
t4	32	1.63	66.50	17.36	3.90	11.97	0.49
t5	40	1.56	69.80	14.73	4.09	12.69	0.44
t6	48	2.60	70.30	14.33	3.28	9.59	0.95
t7	56	2.89	72.90	12.25	4.54	14.42	1.06
t8	64	2.36	71.50	13.37	3.62	10.89	0.86
t9	72	3.31	69.50	14.97	3.64	10.97	1.20

X rata2	ΔX	$\Delta X/\Delta t$	S rata2	ΔS	$\Delta S/\Delta t$	P rata2	ΔP	$\Delta P/\Delta t$	μ
0.626	1.252	0.1565	29.6779	20.6442	2.580525	0.5362	1.0724	0.13405	0.25
1.1755	-0.153	-0.01913	12.892	12.9276	1.61595	1.66605	1.1873	0.148413	-0.01627
1.3605	0.523	0.065375	13.4107	-13.965	-1.74563	3.58105	2.6427	0.330338	0.048052
1.6275	0.011	0.001375	18.877	3.0324	0.37905	6.4727	3.1406	0.392575	0.000845
1.5955	-0.075	-0.00937	16.0441	2.6334	0.329175	8.40685	0.7277	0.090963	-0.00588
2.078	1.04	0.13	14.5279	0.399	0.049875	7.21955	-3.1023	-0.38779	0.06256
2.746	0.296	0.037	13.291	2.0748	0.25935	8.0813	4.8258	0.603225	0.013474
2.6265	-0.535	-0.06688	12.8122	-1.1172	-0.13965	8.7324	-3.5236	-0.44045	-0.02546
2.8355	0.953	0.119125	14.1688	-1.596	-0.1995	7.0089	0.0766	0.009575	0.042012

Tabel C.6 Data percobaan dan pengolahan data pada konsentrasi amilum 40 g/l, 200 rpm

No.	Waktu (jam)	Biomassa (g/l)	Konsentrasi gula total		Konsentrasi asam laktat		Ln Xt
			%T	(g/l)	DHL (mS/cm)	(g/l)	
t0	0	0.00		40.00	1.80	3.92	
t1	8	1.25	73.10	12.09	2.16	5.30	0.22
t2	16	2.04	76.00	9.78	2.21	5.49	0.71
t3	24	1.89	78.70	7.63	2.47	6.49	0.63
t4	32	2.61	77.50	8.58	2.03	4.80	0.96
t5	40	2.83	75.90	9.86	2.01	4.73	1.04
t6	48	3.19	78.00	8.18	2.21	5.49	1.16
t7	56	4.65	75.80	9.94	2.07	4.96	1.54
t8	64	4.75	78.10	8.10	2.33	5.95	1.56
t9	72	6.30	77.00	8.98	2.39	6.18	1.84

X rata2	ΔX	$\Delta X/\Delta t$	S rata2	ΔS	$\Delta S/\Delta t$	P rata2	ΔP	$\Delta P/\Delta t$	μ
0.625	1.25	0.15625	26.047	27.906	3.48825	0.6894	1.3788	0.17235	0.25
1.6455	0.791	0.098875	10.9369	2.3142	0.289275	1.47455	0.1915	0.023937	0.060088
1.9635	-0.155	-0.01938	8.7025	2.1546	0.269325	2.0682	0.9958	0.124475	-0.00987
2.248	0.724	0.0905	8.104	-0.9576	-0.1197	1.7235	-1.6852	-0.21065	0.040258
2.7215	0.223	0.027875	9.2212	-1.2768	-0.1596	0.8426	-0.0766	-0.00958	0.010243
3.0105	0.355	0.044375	9.0217	1.6758	0.209475	1.1873	0.766	0.09575	0.01474
3.9205	1.465	0.183125	9.0616	-1.7556	-0.21945	1.3022	-0.5362	-0.06702	0.04671
4.702	0.098	0.01225	9.0217	1.8354	0.229425	1.532	0.9958	0.124475	0.002605
5.524	1.546	0.19325	8.5429	-0.8778	-0.10972	2.1448	0.2298	0.028725	0.034984

Tabel C.7 Data percobaan dan pengolahan data pada konsentrasi amilum 40 g/l, 250 rpm

No.	Waktu (jam)	Biomassa (g/l)	Konsentrasi gula total		Konsentrasi asam laktat		Ln Xt	(So - S)
			%T	(g/l)	DHL (mS/cm)	(g/l)		
t0	0	0.00		40.00	1.8	3.92		
t1	8	2.22	65.9	17.84	2.03	4.80	0.80	2
t2	16	2.05	66.3	17.52	1.97	4.58	0.72	2
t3	24	2.04	69.5	14.97	2.13	5.19	0.71	2
t4	32	2.92	73.7	11.62	2.04	4.84	1.07	2
t5	40	3.32	73.7	11.62	2.08	5.00	1.20	2

t6	48	3.52	70.6	14.09	2.01	4.73	1.26	2
t7	56	3.70	74.3	11.14	2.05	4.88	1.31	2
t8	64	3.88	71.7	13.21	2	4.69	1.35	2
t9	72	6.64	74.7	10.82	2.08	5.00	1.89	2

X rata2	ΔX	$\Delta X/\Delta t$	S rata2	ΔS	$\Delta S/\Delta t$	P rata2	ΔP	$\Delta P/\Delta t$	μ
1.109	2.218	0.27725	28.9198	22.1604	2.77005	0.44045	0.8809	0.110113	0.25
2.1325	-0.171	-0.02138	17.68	0.3192	0.0399	0.766	-0.2298	-0.02873	-0.01002
2.0435	-0.007	-0.00088	16.2436	2.5536	0.3192	0.9575	0.6128	0.0766	-0.00043
2.4815	0.883	0.110375	13.291	3.3516	0.41895	1.09155	-0.3447	-0.04309	0.044479
3.1235	0.401	0.050125	11.6152	0	0	0.9958	0.1532	0.01915	0.016048
3.4195	0.191	0.023875	12.8521	-2.4738	-0.30923	0.93835	-0.2681	-0.03351	0.006982
3.609	0.188	0.0235	12.6127	2.9526	0.369075	0.8809	0.1532	0.01915	0.006511
3.789	0.172	0.0215	12.1738	-2.0748	-0.25935	0.86175	-0.1915	-0.02394	0.005674

Lampiran D. Foto-foto Penelitian



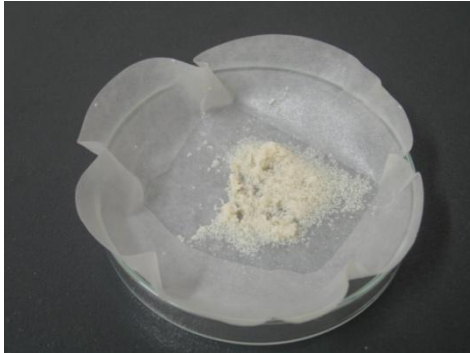
Gambar D.1 Kultur murni *Rhizopus oryzae* pada media agar miring



Gambar D.2 Proses fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* pada media produksi campuran tepung tapioka dan limbah cair tahu



Gambar D.3 Proses penyaringan biomassa *Rhizopus oryzae*



Gambar D.4 Pellet biomassa *Rhizopus oryzae* sebelum dikeringkan



Gambar D.5 Sampel cairan fermentasi yang mengandung asam laktat



Gambar D.6 *Incubator Shaker*



Gambar D.7 Autoclave



Gambar D.8 Spectronic Genesis



Gambar D.9 *Minicentrifuge*



Gambar D.10 *Conductometer*

